

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Papel del ectodominio de la proteína E2 del virus de la hepatitis C en la
unión y entrada del virus en la célula**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Ortega Atienza

Directores

**Francisco Gavilanes Franco
Belén Yélamos López**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DEL ECTODOMINIO DE LA
PROTEÍNA E2 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA
UNIÓN Y ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA**

Directores de la tesis:

Dr. Francisco Gavilanes Franco
Dra. Belén Yélamos López

TESIS DOCTORAL

por

Sara Ortega Atienza
Madrid, 2012

“El encadenamiento de causas y efectos es la ciencia. Si ese encadenamiento no existiera, ya no habría asidero alguno; todo podría ser verdad.”

Pío Baroja, *El árbol de la ciencia*

A mi familia

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Francisco Gavilanes Franco y la Dra. Belén Yélamos López, por haberme dado la oportunidad de realizar el presente trabajo y por haberme ayudado, aconsejado y apoyado durante su realización. Y casi en igual medida, al Dr. Julián Gómez Gutiérrez, que ha sido como mi tercer director de tesis. También quiero agradecer a mis compañeros de grupo, tanto a los que me precedieron y ayudaron en mis inicios, como la Dra. Mar Rodríguez-Rodríguez y el Dr. Daniel Tello Pernas, como a los que se han incorporado posteriormente, como Laura, gracias por tu apoyo, por estar dispuesta a ayudarme siempre que lo he necesitado y mucho ánimo con tu trabajo.

Asimismo quiero agradecer al Dr. Arvind Patel, del Centro para la Investigación de Virus de la Universidad de Glasgow (Escocia), por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia breve en su laboratorio y haberme tratado como a un miembro más de su grupo de investigación. También quiero dar las gracias al grupo dirigido por el Dr. Pedro Majano del Hospital la Princesa de Madrid, que me ayudaron a poner a punto varios protocolos incluidos en la presente tesis, y siempre han estado dispuestos a echarme una mano.

Al resto de mis compañeros de laboratorio les quiero agradecer todos los buenos momentos que hemos pasado juntos y toda la ayuda que me han prestado a lo largo de todo este tiempo. En especial, quisiera destacar a mi compañera de “despacho”, Clara, por todo su apoyo y ayuda, tanto personal como profesional, y también a Lucía, María, Sara Abián, Jaime, Angélica y Juan, que han sido con los que he compartido más tiempo en el laboratorio. Tampoco me olvido de Elena, que me ayudó con los espectros de infrarrojo, y de Ruth, que ha sido mi compañera de “despacho” en la última etapa, gracias por vuestra paciencia. A todos ellos y a los que se han incorporado más recientemente les deseo lo mejor en el futuro.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero expresar mi agradecimiento a mi familia y amigas (Ángela, Carmen, Cristina, Lorena, Marta y Susana). Mil gracias por todo vuestro apoyo, vuestra paciencia y por estar ahí siempre.

Gracias a todos por haber contribuido a hacerme más fácil y agradable mi camino hasta este momento tan especial.

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C</u>	7
1.1. <u>PERSPECTIVA GENERAL</u>	7
1.2. <u>ESTRUCTURA DEL HCV</u>	9
1.3. <u>EL GENOMA VIRAL</u>	11
1.3.1. REGIONES NO CODIFICANTES.....	11
1.4. <u>PROTEÍNAS VIRALES</u>	13
1.4.1. <u>PROTEÍNAS ESTRUCTURALES</u>	14
1.4.1.1. La proteína del core	14
1.4.1.2. La proteína F o ARFP	15
1.4.1.3. Las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2	16
1.4.2. <u>LA PROTEÍNA p7</u>	24
1.4.3. <u>LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NS)</u>	25
1.5. <u>EL CICLO INFECTIVO DEL HCV</u>	27
1.5.1. <u>MODELOS PARA EL ESTUDIO DEL CICLO VIRAL</u>	27
1.5.2. <u>UNIÓN Y ENTRADA DEL HCV EN LAS CÉLULAS DIANA</u>	29
1.5.2.1. <u>Receptores del HCV</u>	31
1.5.2.2. <u>Endocitosis</u>	39
1.5.3. <u>FUSIÓN</u>	40
1.5.4. <u>REPLICACIÓN</u>	42
1.5.5. <u>ENSAMBLAJE VIRAL Y LIBERACIÓN</u>	44
1.6. <u>RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN</u>	46
<u>2. OBJETIVOS</u>	49
<u>3. MATERIALES</u>	55
3.1. <u>MICROORGANISMOS</u>	55
3.1.1. <u>CEPAS DE <i>E. coli</i></u>	55
3.1.2. <u>LÍNEAS CELULARES DE INSECTO</u>	55
3.1.3. <u>LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO</u>	56
3.2. <u>VECTORES PLASMÍDICOS</u>	56

3.2.1. PLÁSMIDOS PARA LA MANIPULACIÓN DEL ADN	56
3.2.2. PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS.....	57
RECOMBINANTES EN <i>E. coli</i>	
3.2.3. PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS.....	57
RECOMBINANTE EN <i>BACULOVIRUS</i>	
3.2.4. PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE	58
PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES EN CÉLULAS HEK 293T	
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	59
3.3.1. MEDIOS DE CULTIVO DE <i>E. coli</i>	59
3.3.2. MEDIOS DE CULTIVO DE <i>BACULOVIRUS</i>	59
3.3.3. MEDIOS DE CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.....	59
3.4. <u>DISOLUCIONES DE USO GENERAL</u>	59
 4. <u>MÉTODOS</u>	 60
4.1. <u>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR COMUNES</u>	60
4.1.1. AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR	60
4.1.2. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	61
4.1.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	61
4.1.4. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	61
4.1.5. LIGACIONES	62
4.1.6. SECUENCIACIÓN DE ADN	62
4.2. <u>MANIPULACIÓN DE ADN PLASMÍDICO BACTERIANO</u>	62
4.2.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE	62
<i>E. coli</i>	
4.2.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	63
4.2.3. "MINIS" DE COLONIAS	63
4.2.4. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	64
4.3. <u>EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES</u>	64
4.3.1. EXPRESIÓN EN <i>E. coli</i>	64
4.3.2. EXPRESIÓN EN <i>BACULOVIRUS</i>	65
4.3.2.1. Generación de baculovirus recombinantes por	66
cotransfección	
4.3.2.2. Ensayo en placa.....	67
4.3.3.3. Amplificación de baculovirus recombinantes	69
4.4. <u>PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXTENSIÓN DE HISTIDINAS</u>	70

4.4.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	70
EXPRESADAS EN <i>TRICHOPLUSIA NI</i>	
4.5. PURIFICACIÓN DE LEL-CD81- GST	71
4.6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	72
4.7. INMUNODETECCIÓN.....	73
4.7.1. DETECCIÓN DE LA EXTENSIÓN DE HISTIDINAS	73
4.7.2. DETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-E2 y ANTI-E1	74
4.8. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA).....	74
4.8.1. ELISA CON SUEROS DE PACIENTES	74
4.8.2. ELISA CON H53.....	75
4.8.3. ELISA DE UNIÓN DE E2 A CD81-GST	75
4.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	76
4.9.1. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS	76
4.9.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN	77
4.10. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL EXTREMO AMINO	77
TERMINAL DE PROTEÍNAS	
4.11. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MOLECULARES	77
4.12. ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR.....	78
4.12.1. CÁLCULO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA	78
4.13. ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA	79
4.13.1. EMISIÓN DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA.....	79
4.14. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE.....	79
FOURIER EN MODO DE REFLEXIÓN TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)	
4.14.1. ADQUISICIÓN DE ESPECTROS FTIR-ATR.....	80
4.14.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	81
DE PROTEÍNAS	
4.14.3. DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN MOLECULAR	81
4.15. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA	82
4.16. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LÍPIDOS.....	83
4.16.1. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS.....	83
4.16.2. VALORACIÓN DE FÓSFORO.....	83
4.16.3. ENSAYO DE AGREGACIÓN DE VESÍCULAS DE	84
FOSFOLÍPIDOS	
4.16.4. ENSAYO DE MEZCLA DE LÍPIDOS	84

4.16.5. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CONTENIDOS	86
ACUOSOS	
4.16.6. POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA.....	87
4.17. MICROSCOPÍA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA	88
4.18.1. INHIBICIÓN DE LAS VÍAS DE ENTRADA EN	89
LA CÉLULA POR DROGAS	
4.18. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA	89
(FACS)	
4.19. PRODUCCIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS INFECCIOSAS.....	90
DEL HCV (HCV _{PP})	
4.19.1. PURIFICACIÓN DE HCVPP EN COJÍN DE SACAROSA	91
4.20. INFECCIÓN DE CÉLULAS Huh7 CON HCV _{PP}	92
4.20.1. NEUTRALIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DE HCV _{PP}	92
5. RESULTADOS.....	93
5.1. MUTANTES DE DELECCIÓN DE LOS PÉPTIDOS DE.....	95
FUSIÓN DE E2 ₆₆₁	
5.1.1. MUTANTES DE FUSIÓN SEGÚN EL PERFIL DE	95
HIDROFOBICIDAD	
5.1.1.1. Clonación	96
5.1.1.2. Expresión y purificación	99
5.1.1.3. Caracterización estructural.....	102
5.1.1.4. Estudio de la estructura de las proteínas en.....	108
presencia de lípidos: Espectros FTIR- ATR	
5.1.1.5. Caracterización funcional: Estudios de interacción.....	111
en presencia lípido-proteína	
5.1.2. MUTANTE DE FUSIÓN SEGÚN EL PATRÓN DE	118
PUENTES DISULFURO: E2 _{Δ502}	
5.1.2.1. Clonación	118
5.1.2.2. Expresión y purificación	119
5.1.2.3. Caracterización estructural.....	121
5.1.3. IMPLICACIÓN DE E1 EN LAS PROPIEDADES.....	126
FUSOGÉNICAS: E2 _{TM} E1	
5.1.3.1. Clonación	126
5.1.3.2. Expresión y purificación	127

5.1.3.3. Caracterización estructural.....	128
5.1.3.4. Caracterización funcional: Estudios de interacción	133
lípid-proteína	
5.2. <u>IMPLICACIÓN DE LA CYS 652 EN EL ESTADO DE</u>	139
<u>OLIGOMERIZACIÓN DE E2₆₆₁</u>	
5.2.1. CLONACIÓN	139
5.2.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN.....	141
5.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN.....	142
5.2.4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	145
5.2.4.1. Caracterización espectroscópica	145
5.2.5. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA.....	147
5.2.6. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA EN PRESENCIA DE	149
LÍPIDOS: ESPECTROS FTIR- ATR	
5.2.7. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: ESTUDIOS DE	151
INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA	
5.2.7.1. Ensayo de agregación.....	151
5.2.7.2. Mezcla de lípidos.....	152
5.2.7.3. Liberación de contenidos acuosos.....	153
5.2.7.4. Polarización de fluorescencia	154
5.3. <u>EFEECTO DE E1 EN EL PLEGAMIENTO DE E2</u>	156
5.3.1. CLONACIÓN	157
5.3.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN.....	158
5.3.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	161
5.3.4. CARACTERIZACIÓN OLIGOMÉRICA	162
5.3.5. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA.....	163
5.3.6. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA.....	165
5.4. <u>IMPLICACIÓN DE E2 EN LA UNIÓN Y ENTRADA DEL</u>	167
<u>VIRUS EN LA CÉLULA</u>	
5.4.1. ESTUDIOS DE UNIÓN A LOS RECEPTORES	167
CELULARES	
5.4.1.1. Elisa de unión a CD81-GST	168
5.4.1.2. FACS de unión a CD81	170
5.4.1.3. Estudios de colocalización con los receptores	173
celulares CD81, SRBI y Claudina I.	

5.4.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LAS RUTAS DE ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA	175
5.4.3. ESTUDIOS DE BLOQUEO DE LA INFECCIÓN DE HCVpp EN..... CÉLULAS Huh7	182
5.4.3.1. Bloqueo de la infección de HCVpp por E2 soluble.....	182
5.4.3.2. Bloqueo de la infección de HCVpp por anti-E2 ₆₆₁ de conejo	188
6. <u>DISCUSIÓN</u>	191
6.1. <u>MUTANTES DE DELECCIÓN DE LOS PÉPTIDOS DE FUSIÓN</u> <u>DE E2₆₆₁</u>	193
6.2. <u>IMPLICACIÓN DE LA CYS 652 EN EL ESTADO DE</u> <u>OLIGOMERIZACIÓN DE E2₆₆₁</u>	208
6.3. <u>EFFECTO DE E1 EN EL PLEGAMIENTO DE E2</u>	213
6.4. <u>IMPLICACIÓN DE E2 EN LA UNIÓN Y ENTRADA</u> <u>DEL VIRUS EN LA CÉLULA</u>	217
6.4.1. ESTUDIOS DE UNIÓN A LOS RECEPTORES CELULARES	218
6.4.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LAS RUTAS DE ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA	221
6.4.3. BLOQUEO DE LA INFECCIÓN DE HCVpp EN CÉLULAS Huh7	225
7. <u>CONCLUSIONES</u>	231
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	235

ABREVIATURAS

AcNPV	Virus multicápsida de la polihedrosis nuclear <i>Autographa californica</i>
A _n	Absorbancia a la longitud de onda n (nm)
ANTS	Ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico
ATR	Reflexión total atenuada
β-mCD	β-metil-ciclodextrina
BSA	Albúmina de suero bovino
CCA	Convex Constraint Analysis
CHO	Células de ovario de hámster chino
CLDN1	Claudina1
CMV	Citomegalovirus
CytD	Citocalasina D
Da	Dalton
DC	Dicroísmo Circular
DC-SIGN	Lectina tipo C específica de células dendríticas
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DO	Densidad óptica
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPX	Bromuro de N,N'-p-xileno-bis- piridinio
ECL	Quimioluminiscencia aumentada
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
ELISA	Ensayo de inmunounión ligado a enzima
FACS	Clasificación de células activadas por Fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
F _{max}	Fluorescencia máxima
FTIR	Infrarrojo por transformada de Fourier
GAGs	Glucosaminoglicanos
gp	Glicoproteína
HCV	Virus de la hepatitis C
HCV-LPs	Partículas tipo HCV
HCVpp	Pseudopartículas de HCV
HCVcc	Virus HCV en cultivo celular
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-piperazina-1-etanosulfónico
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana

2 | ABREVIATURAS

HVR1/2	Región hipervariable 1 (ó 2) de la proteína E2 del HCV
HRP	Peroxidasa de rábano
HS	Heparán sulfato
HSPG	Proteoglicano tipo heparán sulfato
IF	Intensidad de Fluorescencia
IFN	Interferón
IgM (IgG)	Inmunoglobulina M (o G)
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactósido
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
ISG	Genes estimulados por interferón
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LD	<i>Lipid Droplet</i> o gota lipídica
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLr	Receptor de LDL
LEL	Lazo extracelular grande
L-SIGN	Lectina tipo C específica de hígado
LVP	Lipoviropartícula
MES	Ácido morfolinoetano sulfónico
MOI	Multiplicidad de infección
Mops	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
NBD-PE	N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il) fosfatidiletanolamina
NPC1L1	Niemann Pick tipo C1 tipo 1
NS	Proteína no estructural
NTA	Ácido nitrilotriacético
NTP	Nucleótido trifosfato
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAO	Óxido de fenilarsina
pb	Par(es) de bases de DNA
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Fosfatidilglicerol
PMSF	Fluoruro de p-fenilmetilsulfonilo
RE	Retículo endoplásmico
RET	Transferencia de energía por resonancia

Rh-PE	N-(lisamina)-rodamina B-sulfonil fosfatidiletanolamina
RLUs	Unidades relativas de luminiscencia
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEL	Lazo extracelular pequeño
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SPP	Peptidasa péptido señal
SRBI	Receptor humano scavenger de clase B y tipo I
TAE	Tampón Tris/Ácido acético/EDTA
TEM	Dominios ricos en tetraspaninas
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tm	Temperatura de transición de fase
TMA-DPH	1-(4(trimetilamino)fenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno
Tmb	Transmembrana
Tni	<i>Trichoplusia ni</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
[Θ] _{MRW}	Elipticidad molar por residuo de aminoácido

INTRODUCCIÓN

1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

1.1. PERSPECTIVA GENERAL

El virus de la hepatitis C (HCV) es la principal causa de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis y cáncer hepático. Fue identificado por primera vez por Choo y col. en 1989. Antes de su descubrimiento, simplemente se sabía de la existencia de una enfermedad desconocida de transmisión sanguínea y naturaleza infecciosa que era llamada “hepatitis no A no B”. Este nombre se debe a que la enfermedad causaba inflamación del hígado pero era diferente de la hepatitis A y B, que ya eran conocidas.

Según la Organización Mundial de la Salud, en la actualidad hay unos 170 millones de personas infectadas por el HCV en el mundo, aproximadamente un 3% de la población, y cada año aparecen 3 ó 4 millones de casos nuevos. Además, el virus puede permanecer silente durante décadas, por lo que en los próximos años podría multiplicarse el número de personas con hepatitis C crónica que en este momento no saben que están infectadas. El contagio se produce por contacto directo con sangre infectada, principalmente mediante transfusiones de sangre no testada y por reutilización de agujas y jeringuillas que no han sido adecuadamente esterilizadas. Un 75-85% de las infecciones por HCV se hacen crónicas, y de éstas, aproximadamente el 10-20% desarrolla cirrosis y un 1-5% carcinoma hepatocelular en un periodo de 20 a 30 años (Cohen, 1999). Sin embargo, alrededor del 15-20% de los infectados pueden eliminar el virus sin necesidad de medicamentos.

Otra complicación adicional, es que existen al menos 6 genotipos del HCV divididos en varios subtipos (Kielian y Rey, 2006), y el tratamiento varía según el genotipo. El tratamiento estándar en la actualidad frente a la infección por el HCV es la terapia combinada con ribavirina, un agente antiviral inespecífico, e interferón- α (IFN- α), que activa el sistema inmune e impide la replicación viral. Sin embargo, sólo un 30-40% de los pacientes responde a esta terapia (Feld y Hoofnagle, 2005), y la eficacia del tratamiento depende del genotipo del virus,

siendo del 50% para los pacientes con genotipo 1, que es el más prevalente (Figura 1). Además el tratamiento es muy prolongado y puede causar serios efectos secundarios, desde fatiga y síntomas típicos de la gripe, hasta anemia y depresión severa.

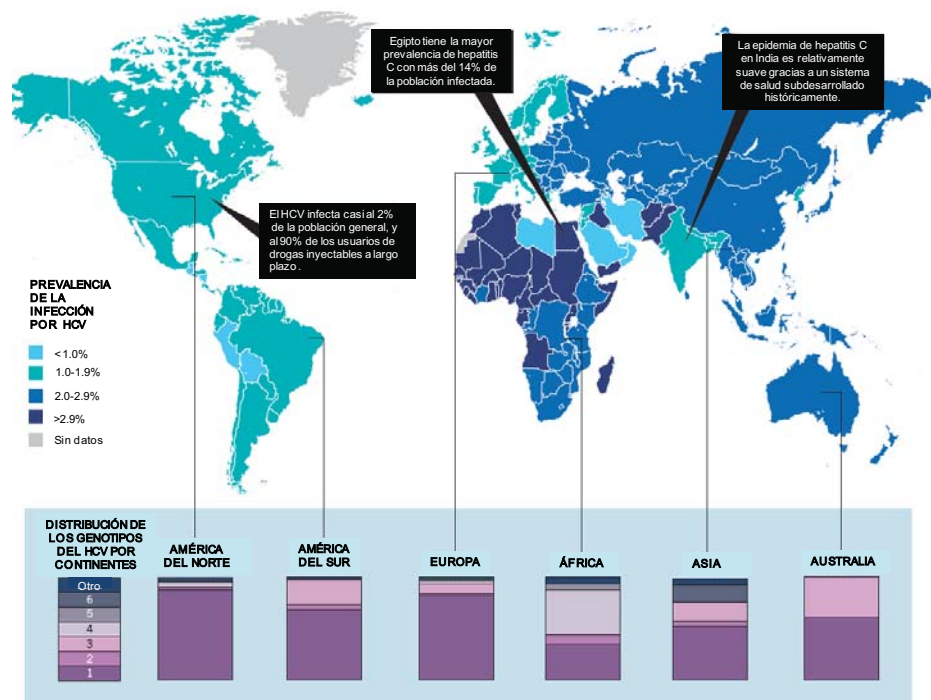


Figura 1. Expansión del HCV en el mundo. El HCV se extiende por todo el mundo con mayor prevalencia en el Norte de África y en el Sur de Asia. Fuente: Centro para el Control de Enfermedades y Prevención de Estados Unidos, base de datos del Proyecto de la Hepatitis C. (Adaptada de Gravitz, 2011).

Actualmente dos nuevos fármacos antivirales están siendo comercializados: el boceprevir (Merck) y el telaprevir (Vertex Pharmaceuticals). Ambos fármacos son inhibidores de la proteasa viral NS3/4A, y han sido diseñados para atacar específicamente al genotipo 1 del virus, que representa el 60% de las infecciones globales. Estas drogas suplementarán, pero no reemplazarán, el tratamiento estándar. En los ensayos en fase III cada droga, en combinación con la terapia estándar, aumenta hasta el 70% la tasa de pacientes curados con genotipo 1, reduciéndose además el tiempo de tratamiento, en

algunos casos, hasta la mitad. El problema es que el virus se replica rápidamente y la tasa de error con la que se replica es elevada, lo que puede llevar a la resistencia del virus a los fármacos. Por ello, sería necesaria una terapia con múltiples drogas que impidieran al virus mutar para hacerse resistente frente a todas, pero que conllevaría más efectos secundarios derivados del tratamiento. De esta forma, la mayoría de los investigadores y los expertos en salud pública coinciden en que, además de mejorar los tratamientos, la solución última sería la vacuna frente al HCV, ya que de otra manera siempre existirán infecciones que provengan de lugares en los que no se dispone de terapias frente al virus. No obstante, el desarrollo de la vacuna es un reto complicado que aún no se ha conseguido tras más de dos décadas de investigación.

1.2. ESTRUCTURA DEL HCV

El HCV es el único miembro del género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Esta clasificación se ha realizado basándose en el perfil de hidrofobicidad y la homología de secuencia con los otros dos géneros incluidos en esta familia: los flavivirus (entre los que se encuentran virus humanos tales como el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue) y los pestivirus (que incluyen el virus de la diarrea bovina viral y el virus de la peste porcina, entre otros) (Lindenbach y Rice, 2001). El HCV es un virus con envoltura que infecta a humanos y a chimpancés, lo que lo diferencia del resto de flavivirus.

La superficie del HCV se encuentra constituida por una envoltura de naturaleza lipídica en donde se encuentran las glicoproteínas estructurales E1 y E2, las cuales juegan un papel fundamental en las primeras etapas del ciclo infeccioso del HCV. La bicapa lipídica recubre la nucleocápsida viral, formada por la proteína C, y dentro de ésta se aloja el genoma del HCV, constituido por una cadena simple de ARN (Figura 2).

El HCV ha sido visualizado por técnicas convencionales de microscopía de transmisión electrónica, observándose partículas de unos 60 nm de diámetro (Kaito *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Prince *et al.*, 1996; Wakita *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007). Hasta la fecha no se han obtenido imágenes de alta resolución del

virus, ni se conoce la estructura tridimensional de las proteínas de la envoltura E1 y E2.

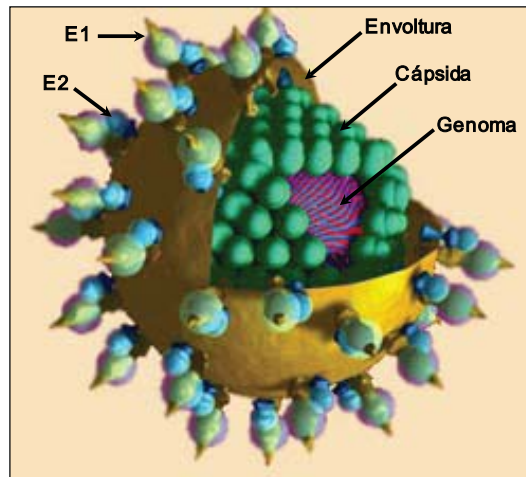


Figura 2. Estructura de la partícula viral del HCV. Modelo tridimensional del HCV diseñado por Louis E. Henderson (Frederick Cancer Research Center). Los viriones constan de una envoltura lipídica, donde se encuentran las glicoproteínas E1 y E2. Esta envoltura recubre la nucleocápsida formada por la proteína C, en cuyo interior se encuentra el genoma viral.

La densidad del HCV circulante en la sangre de los pacientes es muy heterogénea, ya que puede encontrarse en su forma libre o asociado con lipoproteínas de alta, baja o muy baja densidad o con inmunoglobulinas (Agnello *et al.*, 1999; Hijikata *et al.*, 1993; Kanto *et al.*, 1994; Manzin *et al.*, 1998; Monazahian *et al.*, 2000; Pumeechockchai *et al.*, 2002; Thomssen *et al.*, 1992). La mayor parte de las partículas virales circulantes en la sangre están asociadas con β -lipoproteínas y VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), y con LDL (lipoproteínas de baja densidad) (Thomssen *et al.*, 1992; André *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2006). Diversos estudios sugieren que las partículas asociadas a lipoproteínas representan las especies de mayor infectividad, mientras que los viriones libres son poco infecciosos (Bradley *et al.*, 1991; Hijikata *et al.*, 1993).

1.3. EL GENOMA VIRAL

El HCV presenta un genoma de unas 9.6 kilobases constituido por una cadena sencilla de ARN positivo flanqueado por las regiones 5' y 3' no codificantes o UTR (del inglés "untranslated region") que están implicadas en la replicación y la traducción (Friebe *et al.*, 2001; Friebe *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Murayama *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2006). El genoma contiene un único marco de lectura abierto que codifica una poliproteína de unos 3000 aminoácidos (Choo *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1990), la cual es posteriormente procesada por una combinación de proteasas virales y celulares para originar las proteínas estructurales (C, E1, E2 y p7) y no estructurales del virus (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Figura 3).

1.3.1. REGIONES NO CODIFICANTES

La región 5'-UTR es la secuencia más conservada de todo el genoma del HCV. Contiene 341 nucleótidos y está constituida por cuatro dominios altamente estructurados en forma de lazos que se enumeran de I a IV (Honda *et al.*, 1996b) (Figura 4). Los dominios II, III y IV, junto con los primeros 12-30 nucleótidos de la región que codifica la proteína C, constituyen el sitio interno de entrada del ribosoma, IRES (del inglés "Internal Ribosome Entry Site") (Honda *et al.*, 1996a). A través de una interacción directa con el elemento IRES, la subunidad 40S del ribosoma es reclutada en las proximidades del codón de inicio, colocándose directamente el codón AUG en el sitio P del ribosoma, y eliminando el requerimiento de una estructura 5'cap y la exploración del ribosoma previas a la iniciación de la traducción (Hellen y Sarnow, 2001). Las estructuras de ARN por delante del lazo IV son esenciales para la actividad traduccional (Honda *et al.*, 1996a; Rijnbrand *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995), pero el lazo I (nucleótidos 5 a 20) parece tener una acción opuesta, ya que su delección aumenta la actividad del IRES *in vivo* e *in vitro* (Honda *et al.*, 1996a; Rijnbrand *et al.*, 1995).

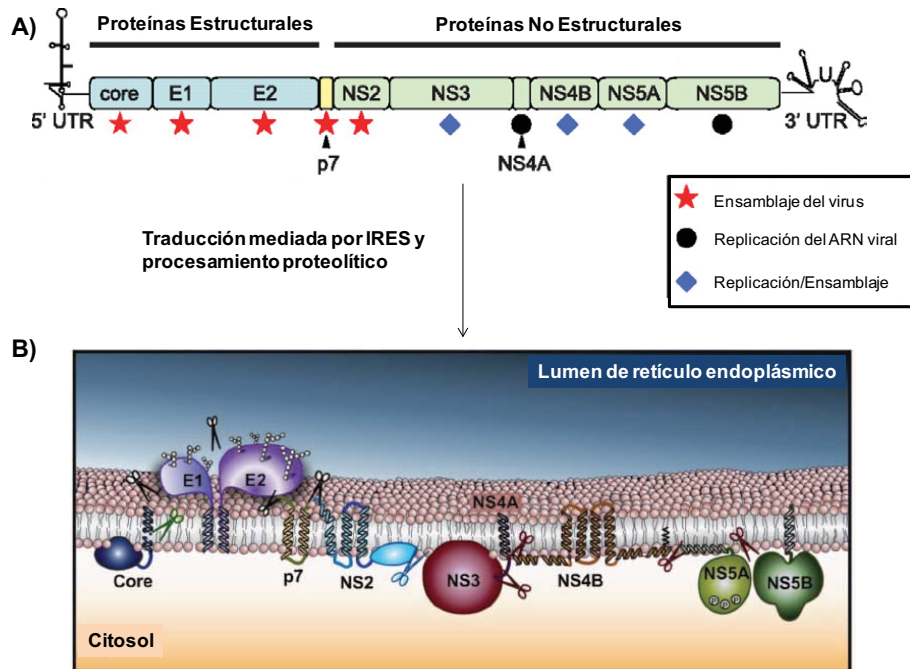


Figura 3. Representación esquemática del genoma del HCV (A) y su procesamiento (B). (A) Las regiones 5'-UTR y 3'-UTR flanquean el marco de lectura abierto del HCV que se traduce en una poliproteína que posteriormente es procesada para dar lugar a las proteínas estructurales (azul) y no estructurales (verde) del HCV. La proteína p7 no suele asignarse a ninguna de las dos categorías (amarillo). Los símbolos de colores indican la función de cada proteína. (B) Las tijeras en negro indican el procesamiento proteolítico por la peptidasa señal y en verde por la peptidasa péptido señal. Las tijeras azules indican el procesamiento autocatalítico por la proteasa NS2/3, y las granates por la proteasa NS3/4A. (Adaptada de Alvisi *et al.*, 2011 y Jones *et al.*, 2010).

La región 3'-UTR, dividida en tres horquillas SL (del inglés "stem loop") (Figura 4), está compuesta por una secuencia poco conservada de aproximadamente 40 nucleótidos, un tramo interno de longitud variable de poli U/UC y una secuencia altamente conservada de 98 nucleótidos, de los cuales los 45 últimos forman una estructura en forma de lazo muy estable denominada Tallo-X (Blight y Rice, 1997; Friebe y Bartenschlager, 2002; Tanaka *et al.*, 1995, 1996). Varios estudios sugieren que, además de jugar un papel importante en la replicación del ARN, la región 3'-UTR, y en particular el Tallo-X, estabiliza el ARN y aumenta la traducción en ensayos *in vitro* y en células transfectadas (Ito *et al.*, 1998; Spangberg *et al.*, 2001). El alto porcentaje de identidad en esta

región entre los distintos genotipos del HCV sugiere que podría ser importante para la iniciación de la síntesis de la hebra negativa, ya que los ARNs del HCV que no poseen esa región son incapaces de replicarse en chimpancés (Kolykhalov *et al.*, 2000).

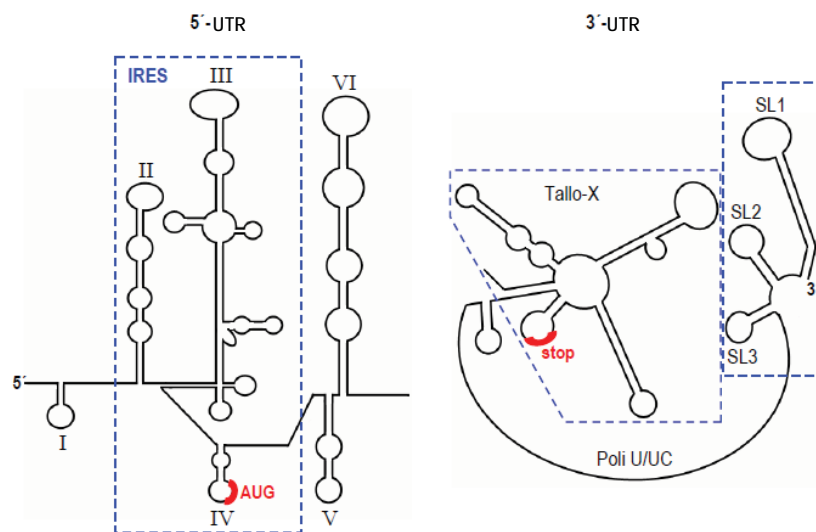


Figura 4. Estructura secundaria de las regiones 5'-UTR y 3'-UTR (Honda *et al.*, 1996a; Yanagi *et al.*, 1999). En rojo se muestran los sitios de iniciación y terminación de la traducción.

1.4. PROTEÍNAS VIRALES

El marco de lectura abierto del HCV contiene de 9024 a 9111 nucleótidos dependiendo del genotipo y codifica una poliproteína cuyo procesamiento postraduccional genera 10 proteínas virales: 3 proteínas estructurales (C, E1 y E2), la proteína p7 y 6 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B).

El procesamiento proteolítico de la poliproteína es llevado a cabo por cuatro proteasas, dos virales y dos celulares. La peptidasa señal, enzima celular presente en el retículo endoplásmico (RE), parece ser la principal responsable del procesamiento de las proteínas estructurales en los sitios C/E1, E1/E2, E2/p7 y p7/NS2. Además, se produce una segunda digestión en la región carboxilo

terminal de la proteína C por la peptidasa péptido señal (SPP). El sitio NS2/3 es procesado autocatalíticamente por una actividad proteasa localizada en la región NS2/NS3, mientras que el resto de las proteínas no estructurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) se origina por acción de la serín-proteasa viral NS3 y su cofactor NS4A (Figura 3). Se han encontrado formas alternativas de la proteína C generadas por la iniciación interna de la traducción de un marco de lectura alternativo, o bien por desplazamientos ribosomales (Branch *et al.*, 2005). Estas proteínas se denominan ARF o proteínas F (del inglés, “alternative reading frame”).

En la Tabla 1 se muestra un resumen de las funciones más importantes desempeñadas por cada proteína viral.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Core	Unión a ARN; formación de la nucleocápsida
E1	Proteína de la envoltura; se asocia con E2
E2	Proteína de la envoltura; unión a receptores celulares; se asocia con E1
p7	Canal iónico
NS2	Componente de la proteasa NS2-3
NS3	Dominio amino terminal con actividad proteasa Dominio carboxilo terminal NTPasa y helicasa
NS4A	Cofactor de la proteasa NS3
NS4B	Induce alteraciones en la membrana
NS5A	Fosfoproteína
NS5B	ARN polimerasa dependiente de ARN

Tabla 1. Resumen de las funciones más importantes desempeñadas por las proteínas del HCV en el ciclo viral.

1.4.1. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

1.4.1.1. La proteína del core

La proteína C es una proteína dimérica (Boulant *et al.*, 2005) que forma la nucleocápsida del virus y presenta tres dominios funcionales: un dominio amino

terminal básico (D1, residuos 1-120) que interaccionaría con el ARN viral durante la formación de la nucleocápsida mediante interacciones electrostáticas (Santolini *et al.*, 1994), un dominio central hidrofóbico (D2, residuos 121-179) formado por dos hélices anfipáticas que se une a la cara extracelular del RE, y un dominio carboxilo terminal (D3, residuos 180-191) que es el péptido señal para el procesamiento de E1. Dicha secuencia señal dirige la cadena polipeptídica nascente a la membrana del RE e induce la traslocación de la región de E1 al lumen del RE, a la vez que la proteína C queda en el lado citosólico (Santolini *et al.*, 1994; Walter y Johnson, 1994). El corte por la peptidasa señal en el lado luminal del RE separa E1 de la forma inmadura de la proteína C (p23), que contiene 191 aminoácidos y que es considerada como la forma completa que se encuentra anclada en la bicapa lipídica del RE por el péptido señal del extremo carboxilo terminal (McLauchlan *et al.*, 2002). Una vez liberada la proteína, un segundo corte proteolítico catalizado por la peptidasa péptido señal elimina el anclaje carboxilo-terminal quedando la forma madura (p21) libre para desplazarse a otros orgánulos, como los LDs (del inglés “Lipid Droplets”), que son orgánulos dinámicos que almacenan lípidos como triglicéridos y ésteres de colesterol rodeados por una monocapa fosfolipídica, y han sido postulados como los lugares donde tendría lugar el ensamblaje de la nucleocápsida (McLauchlan *et al.*, 2002; Miyanari *et al.*, 2007).

Además de su papel en el ensamblaje, la proteína C está implicada en la regulación del metabolismo lipídico de la célula hospedadora. La sobreexpresión de core es suficiente para inducir la formación de LDs en células no hepáticas (Barba *et al.*, 1997) y esteatosis en ratones transgénicos (Moriya *et al.*, 1997).

1.4.1.2. La proteína F o ARFP

Además del marco de lectura abierto (ORF) que codifica la poliproteína, el genoma del HCV contiene un marco lectura solapante +1 (ORF+1), en el mismo gen que codifica la proteína C. La traducción a partir de este marco de lectura alternativo (ARF), probablemente a través de un mecanismo de desplazamiento ribosomal, da lugar a una proteína denominada proteína F o ARFP. La detección de anticuerpos y la evidencia de inmunidad mediada por

células (Bain *et al.*, 2004) frente a esta proteína en el suero de pacientes infectados por el HCV sugiere que esta proteína se expresa durante la infección (Walewski *et al.*, 2001). Su función en el ciclo del virus es desconocida, aunque no se puede excluir la posibilidad de que algunos de los efectos atribuidos a la proteína C sean debidos a la proteína F.

1.4.1.3. Las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2

Las proteínas E1 (gp31) y E2 (gp70), son los componentes principales de la envoltura del HCV y son necesarias para la entrada y la fusión viral (Bartosch *et al.*, 2003a; Nielsen *et al.*, 2004). Son proteínas transmembrana tipo I, altamente glicosiladas, que consisten en un ectodominio amino terminal grande y un dominio transmembrana carboxilo terminal, que ancla cada proteína a la membrana.

1.4.1.3.1. Biogénesis de E1 y E2

Las proteínas E1 y E2 son liberadas de la poliproteína por la acción de las proteasas del retículo endoplásmico de la célula entre los residuos 383/384 y 746/747, respectivamente (Grakoui *et al.*, 1993; Hijikata *et al.*, 1991; Mizushima *et al.*, 1994).

Durante su síntesis, los ectodominios de las glicoproteínas se dirigen al lumen del RE, donde son modificados mediante N-glicosilación, y los dominios transmembrana se insertan en la membrana del RE. Además, los dominios carboxilo terminales de E1 y E2 contienen secuencias de retención en el RE (Cocquerel *et al.*, 1998, 1999), donde la peptidasa señal lleva a cabo los cortes proteolíticos (Dubuisson *et al.*, 2002). Una vez procesadas, la orientación carboxilo terminal de los dominios transmembrana de E1 y E2 cambia de luminal a citosólica, gracias a la participación de un translocón en este proceso (Cocquerel *et al.*, 2002). En la Figura 5 se muestra el modelo propuesto por Cocquerel y col. (2002), para explicar los cambios topológicos que experimentan los dominios transmembrana de E1 y E2 durante su biogénesis.

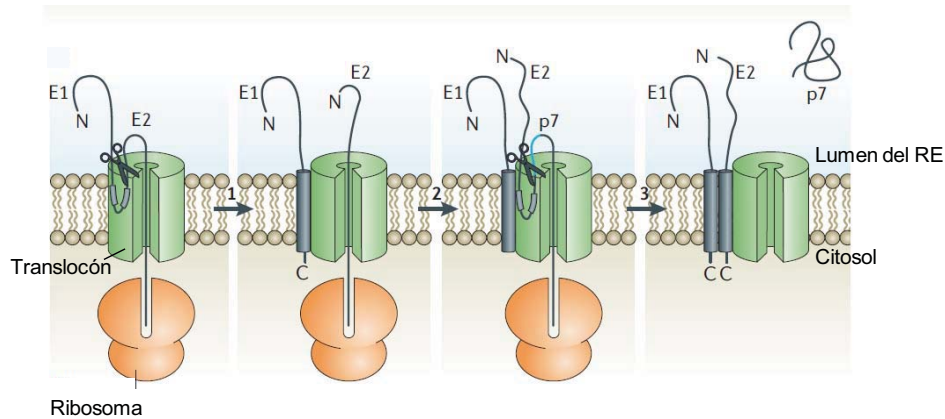


Figura 5. Topología adoptada por los dominios transmembrana de E1 y E2 durante su biogénesis. La poliproteína del HCV E1-E2-p7 está unida al ribosoma y al traslocón. Paso 1) El segmento carboxilo terminal hidrofóbico de E1 inicialmente se inserta como una horquilla con un corto giro citoplasmático, sirviendo como péptido señal para E2. Después del corte por la peptidasa señal luminal (tijeras), el recién generado carboxilo-terminal de E1 atraviesa la membrana convirtiéndose la horquilla en una única hélice transmembrana. Paso 2) De la misma manera, el segmento hidrofóbico de E2 sirve como secuencia señal para p7 y vuelve a insertarse en la membrana una vez liberada p7. Paso 3) p7 carece de segmento hidrofóbico y tras su corte proteolítico, es translocada a través de la membrana (Cocquerel et al., 2002). (Adaptada de von Heijne et al., 2006).

1.4.1.3.2. Glicosilación de E1 y E2

E1 y E2 presentan hasta 6 y 11 sitios potenciales de N-glicosilación, respectivamente (Figura 6). La N-glicosilación ocurre por la transferencia de un oligosacárido de un intermedio lipídico a un residuo de Asn en una secuencia consenso Asn-X-Thr/Ser de una proteína naciente, donde X es cualquier aminoácido excepto Pro (Gavel y von Heijne, 1990; Kornfeld y Kornfeld, 1985). Las N-glicosilaciones son catalizadas por la enzima oligosacariltransferasa, estrechamente asociada al traslocón, que puede acceder a la cadena que emerge del ribosoma en el lado luminal del RE rugoso (Silberstein y Gilmore, 1996). Sin embargo, en el caso de E1, la glicosilación ocurre post-traduccionalmente (Duvet et al., 2002) y se favorece por la coexpresión en *cis* de E2 (Dubuisson et al., 2000).

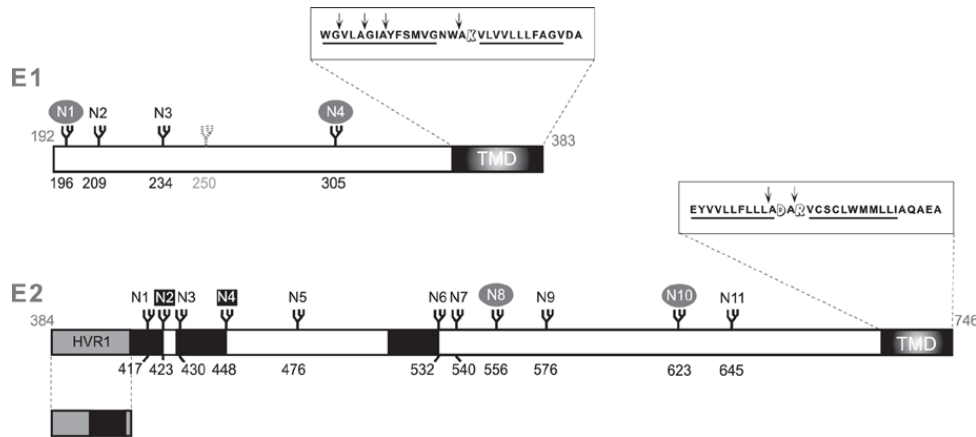


Figura 6. Representación esquemática de las características de E1 y E2 genotipo 1a línea H77. Las posiciones de N-glicosilación se indican con una N seguida de la posición en cada glicoproteína. Los glicanos implicados en la entrada de HCVpp se indican con un cuadrado negro (Goffard *et al.*, 2005). Los sitios de glicosilación cuya mutación altera el plegamiento de E1E2 se indican con un círculo gris (Goffard *et al.*, 2005). La región hipervariable 1 de E2 (HVR1) se muestra como un recuadro gris. Los recuadros negros corresponden a los epítomos de E2 reconocidos por anticuerpos neutralizantes (Hsu *et al.*, 2003). Las secuencias de los dominios transmembrana (TMD) de las glicoproteínas del HCV se indican encima de su correspondiente región en E1 y E2, apareciendo subrayados los dos dominios hidrofóbicos. Los residuos cargados presentes entre las regiones hidrofóbicas aparecen en blanco. Las flechas indican las posiciones de residuos de alanina insertados que impiden la heterodimerización de E1E2 (Op De Beeck *et al.*, 2000).

La naturaleza de las glicosilaciones presentes en E1 y E2 varía en función del sistema empleado para su estudio (Vieyres *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos con el sistema del virus en cultivo celular (HCVcc), que es el sistema que mejor mimetiza la realidad, revelan que la proteína E2 presenta oligosacáridos de tipo complejo, lo que indica el tránsito de la proteína a través del aparato de Golgi, donde los oligosacáridos tipo manosa son modificados por las glicosidasas y glicosiltransferasas presentes en este compartimento (Helenius *et al.*, 2001). A pesar de ello, parte de la proteína E2 asociada a HCVcc presenta oligosacáridos tipo manosa que no han sido modificados por las enzimas presentes en el Golgi.

Mediante análisis mutagénicos en los que se eliminan los sitios de N-glicosilación de las proteínas del HCV, se ha comprobado que, varios de estos sitios son importantes para el plegamiento y la localización en la superficie de las

proteínas, mientras que otros juegan un papel funcional importante o contribuyen a la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Goffard y Dubbuisson, 2003; Goffard *et al.*, 2005) (Figura 6).

La presencia de glicanos en una proteína puede influir en su plegamiento a través del sistema de chaperonas calnexina-calreticulina presente en el RE (Helenius *et al.*, 2001). La calnexina interacciona con las glicoproteínas del HCV pudiendo estar implicada en su plegamiento (Choukhi *et al.*, 1998). Otro estudio más reciente realizado con HCVcc demuestra que las glicosilaciones juegan un papel importante en distintas etapas del ciclo viral, así como en la sensibilidad frente a anticuerpos neutralizantes (Helle *et al.*, 2010).

1.4.1.3.3. Plegamiento de E1 y E2

Estudios realizados utilizando sistemas de expresión transitoria demuestran que E2 interacciona con E1 para dar lugar a oligómeros. En presencia de detergentes no iónicos, se detectan dos tipos de complejos E1E2: por un lado, heterodímeros E1E2 estabilizados por interacciones no covalentes y por otro agregados unidos por puentes disulfuro que, muy probablemente, representen complejos mal plegados (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994).

Se ha sugerido que los dominios transmembrana de estas glicoproteínas juegan un papel importante en la formación de heterodímeros E1E2 (Cocquerel *et al.*, 1998; Michalak *et al.*, 1997; Op de Beeck *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2001). La delección de estos dominios, así como la sustitución de los residuos básicos del segmento hidrofílico conector, anula la formación de heterodímeros E1E2 (Cocquerel *et al.*, 1998, 2000; Michalak *et al.*, 1997). Además, estudios de mutagénesis dirigida (Cocquerel *et al.*, 2000) y de inserción de residuos de alanina en distintas posiciones de estos dominios también impiden la formación de heterodímeros (Op de Beeck *et al.*, 2000) (Figura 6).

Se ha demostrado que el plegamiento de E1 es dependiente de la co-expresión de E2 (Michalak *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2001), y que el plegamiento de E2 a su vez es dependiente de la coexpresión de E1 (Brazzoli *et al.*, 2005; Cocquerel *et al.*, 2003). Estas observaciones indican que las glicoproteínas de la

envuelta del HCV cooperan para la formación de un complejo funcional. Sin embargo, la proteína E2 presenta cierto grado de plegamiento cuando es expresada de manera aislada (Cocquerel *et al.*, 2003; Michalak *et al.*, 1997). Además, estudios más recientes en los que se ha descrito la producción del ectodominio de E2 en células de insecto (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009) o en células de mamífero (Whidby *et al.*, 2009), han permitido demostrar que E2 se comportaría como una unidad de plegamiento independiente.

E1 y E2 parecen interaccionar con la chaperona del RE calnexina (Brazzoli *et al.*, 2005; Chouki *et al.*, 1998; Dubuisson y Rice, 1996; Merola *et al.*, 2001). Ambas glicoproteínas se asociarían rápidamente con la calnexina y se disociarían lentamente, lo que sugiere que esta chaperona intervendría en el plegamiento de E1E2 (Chouki *et al.*, 1998; Dubuisson y Rice, 1996; Merola *et al.*, 2001). Sin embargo, otros datos más recientes sugieren que es sólo E1 la que interaccionaría con calnexina (Brazzoli *et al.*, 2005).

Hasta hace poco se pensaba que la unidad funcional básica de la envoltura viral estaba constituida por el heterodímero E1E2 no covalente (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994; Dubuisson and Rice, 1996; Flint *et al.*, 2004; Op de Beeck *et al.*, 2004). Pero un estudio publicado recientemente (Vieyres *et al.*, 2010), revela que en el sistema de HCVcc, los complejos covalentes son mayoritarios en los virus secretados y minoritarios en las células infectadas, lo que sugiere que estos grandes complejos son incorporados selectivamente en los viriones secretados y no serían agregados mal plegados que se retienen en el RE. De hecho, se ha comprobado que son capaces de mantener una conformación nativa. La elevada masa molecular de los complejos formados por las glicoproteínas asociadas a los viriones sugiere que estas proteínas podrían formar una red organizada en la superficie del virión.

La presencia de puentes disulfuro entre las proteínas de la envoltura del HCV en la superficie del virus puede reflejar su papel durante el ensamblaje viral. Incluso, puede que estas interacciones sean esenciales para facilitar el proceso de morfogénesis y salida. Esta hipótesis explicaría también la falta de sensibilidad de HCVcc al tratamiento con pH ácido (Tscherne *et al.*, 2006). La presencia de los puentes disulfuro entre las glicoproteínas del HCV podría

bloquear los cambios conformacionales en presencia de pH ácido (Vieyres *et al.*, 2010).

1.4.1.3.4. Estructura y función de E1 y E2

Las glicoproteínas E1 y E2 son esenciales para la entrada del virus en los hepatocitos (Bartosch y Cosset, 2006; Cocquerel *et al.*, 2006) y participan en el ensamblaje de partículas infectivas (Wakita *et al.*, 2005). Como ya se ha comentado anteriormente, las glicoproteínas E1 (residuos 192-383) y E2 (residuos 384-746), son proteínas transmembrana de tipo I con un ectodominio amino terminal y un dominio transmembrana carboxilo terminal.

El dominio transmembrana de E1, residuos 353-383 de la poliproteína, está compuesto por dos tramos de residuos hidrofóbicos conectados por un corto segmento hidrofílico, residuos 367-369, en el que hay un residuo de lisina totalmente conservado. Por su parte, el dominio transmembrana de E2, residuos 716-746, posee una organización a nivel de secuencia similar al de E1, con dos residuos cargados altamente conservados (Asp-728 y Arg-730) en el segmento de conexión entre las dos regiones hidrofóbicas (Figura 6). Estos dominios son los responsables de la retención de estas glicoproteínas en el RE y juegan un papel fundamental en la heterodimerización de E1 y E2, además de servir de anclaje de éstas a la membrana (Op de Beeck y Dubuisson, 2003).

Precisamente, la fuerte retención en el RE de las glicoproteínas del HCV hace muy difícil construir células que expresen en su superficie dichas proteínas. Por ello, se han producido formas solubilizadas de las glicoproteínas (ectodominios) en las que se han deletado los dominios transmembrana. Ambos ectodominios cumplen un papel fundamental en las primeras etapas del ciclo infectivo del HCV, ya que en ellos residen tanto los sitios de unión a los receptores presentes en las células hepáticas como los péptidos fusogénicos implicados en la fusión de la membrana de la envoltura viral con la membrana del endosoma celular.

El ectodominio de E2 (residuos 384-661) puede ser expresado independientemente de la poliproteína y se pliega en una estructura capaz de unirse a los receptores celulares (Pileri *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2002). Se ha

conseguido producir eficazmente el ectodominio de E2 tanto en células de insecto mediante su infección con baculovirus recombinantes (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009), como en células de mamífero (Whidby *et al.*, 2009), lo que ha permitido llevar a cabo su caracterización estructural. Este ectodominio está conectado al dominio transmembrana a través de un segmento hidrofóbico con repeticiones de 7 aminoácidos (residuos 675-699), que es esencial para la heterodimerización y para la infectividad (Drummer *et al.*, 2004). Se han identificado dos regiones hipervariables (HVR) en E2, HVR1 y HVR2. Los primeros 27 aminoácidos de E2 (residuos 384-410) constituyen la región HVR1. La aparente variabilidad de esta región parece estar dirigida por la selección de variantes de anticuerpos de escape inmune. El hallazgo de un clon del HCV que carece de dicha región con capacidad infectiva en chimpancés, aunque fuertemente atenuada (Forns *et al.*, 2000), puso de manifiesto la importancia de la región HVR1 en la entrada viral (Bartosch *et al.*, 2003c; Callens *et al.*, 2005). Pese a la variabilidad de secuencia encontrada en HVR1, las propiedades físico-químicas de los residuos en cada posición y la conformación de HVR1 están altamente conservadas entre los distintos genotipos (Penin *et al.*, 2001). La región HVR1 es una región básica y se ha demostrado que estos residuos básicos juegan un papel importante en la modulación de la entrada viral (Callen *et al.*, 2005). La segunda región hipervariable en E2 (HVR2) (residuos 474-482) parece estar implicada en la modulación de la unión de E2 a receptores celulares (Roccasecca *et al.*, 2003).

La caracterización estructural del ectodominio de E2 recombinante mediante estudios de dicroísmo circular (Krey *et al.*, 2010; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009; Whidby *et al.*, 2009) y espectroscopía infrarroja (Krey *et al.*, 2010), indican que la proteína está constituida principalmente por estructuras tipo β y no ordenada, lo que es consistente con la estructura secundaria esperada para una proteína de fusión tipo II. Con base en estos datos, Krey y col. (2010) han propuesto un modelo de organización terciaria del ectodominio de E2 (Figura 7). La determinación de la conexión entre los 18 residuos de Cys presentes en el ectodominio de E2, en combinación con estudios de los sitios de unión con el receptor celular CD81 y con anticuerpos (Drummer *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2006; Roccasecca *et al.*, 2003) ha permitido modelar el ectodominio de E2 en el

plegamiento típico de las proteínas de fusión de tipo II, organizadas en tres dominios. 16 de las 18 Cys estarían formando puentes disulfuro, mientras que el enlace Cys 597-Cys 620 no ha sido asignado definitivamente.

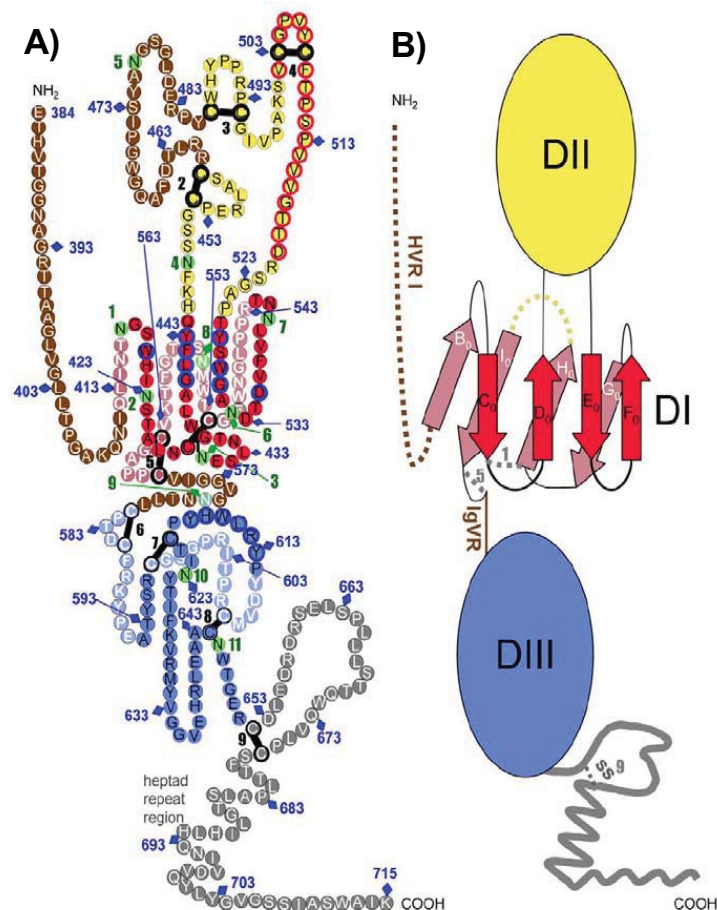


Figura 7. Organización terciaria del ectodominio de E2. (A) La secuencia lineal del ectodominio de E2 genotipo 1a línea H77 ha sido representada como una cadena de cuentas con un plegamiento típico de proteínas de fusión tipo II. Los círculos en color pálido y brillante representan los residuos situados al fondo y al frente de los dominios, respectivamente marcados con letras en color blanco y negro. Los enlaces disulfuro y los sitios de glicosilación se indican como barras negras y círculos verdes, respectivamente, numerados secuencialmente. Los segmentos no estructurados aparecen con letra blanca sobre fondo marrón. Los residuos que participan en la unión con CD81 presentan un contorno azul, y los que forman parte del posible péptido fusogénico presentan un contorno en rojo. (B) Diagrama esquemático de la organización terciaria del ectodominio de E2. Los dominios DI, DII y DIII aparecen en rojo, amarillo y azul, respectivamente. La región *stem* aparece en gris. Se indica la conectividad entre las láminas β en DI. (Krey *et al.*, 2010).

Con respecto a E1, debido a las dificultades para expresar esta proteína por sí sola o como un heterodímero E1E2 soluble, el patrón de puentes disulfuro formado por las 8 Cys presentes en esta proteína no ha sido determinado hasta el momento. Sin embargo, recientemente ha sido descrita la producción de una proteína quimérica que contiene los ectodominios completos de E1 y E2 empleando el sistema de expresión de baculovirus-células de insecto (Tello *et al.*, 2010). Esta proteína quimérica es capaz de unirse a los anticuerpos presentes en el suero de pacientes infectados por el HCV, lo que indicaría que no es necesaria la presencia de los dominios transmembrana para el correcto plegamiento de los complejos E1E2.

En cuanto al aspecto funcional, E1 y E2 son las responsables de la unión y entrada del virus en la célula, siendo E2 la principal responsable de la unión a los receptores celulares. Además, estas glicoproteínas son las responsables de la fusión entre las membranas virales y celulares, existiendo gran controversia en cuanto a la identidad de la proteína fusogénica.

1.4.2. LA PROTEÍNA p7

La proteína de membrana p7 consta de 63 aminoácidos y está compuesta por dos dominios transmembrana con sus extremos amino y carboxilo terminales orientados hacia el lumen del RE (Carrere-Kremer *et al.*, 2002). Se encuentra localizada en el nexo de unión entre las proteínas estructurales y las no estructurales (Lin *et al.*, 1994).

La proteína p7 no se requiere para la replicación del ARN viral y no está claro si es un componente del virión. Pertenece a la familia de las vioporinas (Harada *et al.*, 2000), y es capaz de formar complejos hexa- y heptaméricos que sirven como canales iónicos y son requeridos para el ensamblaje y la liberación del virus (Luik *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que p7 es esencial para la infectividad del HCV en chimpancés (Sakai *et al.*, 2003).

1.4.3. LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NS)

Las proteínas no estructurales del HCV son NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

NS2 es una proteína dimérica integral de membrana, compuesta por dos dominios topológicos y funcionales: un dominio altamente hidrofóbico amino terminal que ancla la proteína a la membrana, y un dominio cisteín-proteasa carboxilo terminal que realiza el corte proteolítico entre el carboxilo terminal de sí misma y NS3 (Hijikata *et al.*, 1993; Lorenz *et al.*, 2006). NS2 no es necesaria para la replicación del genoma (Lohmann *et al.*, 1999) pero juega un papel central en el ensamblaje, para lo cual su actividad proteasa no es requerida (Jirasko *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2011).

NS3 es una proteína de 630 aminoácidos que presenta dos dominios con diferentes actividades enzimáticas esenciales para el ciclo vital del HCV. El segmento amino terminal presenta actividad serín-proteasa, mientras que los dos tercios restantes de la proteína presentan actividad NTPasa y ARN helicasa. La actividad proteasa es más eficiente en combinación con NS4A, que actúa como cofactor no covalente y promueve la asociación a la membrana de NS3. Este complejo es el responsable de la liberación de las proteínas NS de la poliproteína que se encuentran a continuación en el genoma viral. Además, está implicada en el bloqueo de la capacidad de la célula hospedadora de desencadenar una respuesta inmune innata antiviral (Foy *et al.*, 2003). Recientemente se ha propuesto que la helicasa NS3 está implicada en el ensamblaje viral (Ma *et al.*, 2008). La estructura cristalina de cada dominio aislado de NS3 así como de la proteína completa con o sin NS4A ha sido determinada (Kim *et al.*, 1996, 1998; Love *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1999), lo que ha facilitado el diseño de inhibidores y su optimización.

NS4A es una proteína pequeña (54 aminoácidos) formada por tres dominios: un dominio central que actúa como cofactor de NS3, un dominio hidrofóbico amino terminal responsable de la localización de NS4A en la membrana y del reclutamiento de NS3 a la membrana, y un dominio ácido carboxilo terminal que contiene aminoácidos importantes para establecer la replicación del ARN (Lindenbach *et al.*, 2005).

NS4B es la proteína peor caracterizada del HCV debido a su elevada hidrofobicidad. Se cree que es una proteína de membrana oligomérica compuesta por una región amino terminal que contiene dos hélices anfipáticas, un dominio central con cuatro segmentos transmembrana y un dominio carboxilo terminal con dos hélices (Lundin *et al.*, 2003). La expresión ectópica de NS4B en células de mamífero da lugar a alteraciones que semejan las llamadas redes membranosas (del inglés “membranous web”), que se inducen en la infección por el HCV (Egger *et al.*, 2002). Estas redes membranosas han sido propuestas como los lugares donde se ensambla el complejo de replicación viral (Gosert *et al.*, 2003). Además NS4B se puede unir directamente al ARN (Einav *et al.*, 2008) y posee actividades ATPasa y GTPasa, para las que se requiere un sitio de unión a nucleótidos localizado entre las hélices transmembrana 2 y 3 (Einav *et al.*, 2004).

NS5A es la proteína que regula la replicación y el ensamblaje del HCV. Es una metaloproteína dimérica de unión a zinc (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Se compone de cuatro dominios (Tellinghuisen *et al.*, 2004): una hélice anfipática amino terminal esencial para la unión a las membranas celulares y que contribuye a la orientación hacia los LDs (Brass *et al.*, 2002; Hinson y Cresswell, 2009); un dominio D1 de unión a ARN; un dominio D2 débilmente conservado e intrínsecamente desplegado que contribuye a la replicación del ARN (Tellinghuisen *et al.*, 2008a); y un dominio D3 carboxilo terminal crucial para el ensamblaje viral (Apple *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008b). NS5A es la diana de varias quinasas celulares, incluyendo las caseína quinasas 1 y 2 (CK1 y CK2), lo que hace que en células infectadas sea detectada tanto en forma basal como en forma hiperfosforilada (Kaneko *et al.*, 1994). Se asume que el ARN viral recién sintetizado es transportado a los LDs por NS5A (Miyazari *et al.*, 2007) cuyo estado de fosforilación regularía posiblemente el balance entre la replicación del ARN y el ensamblaje del virus (Apple *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 2009; Neddermann *et al.*, 2004; Tellinghuisen *et al.*, 2008b).

NS5B es la ARN polimerasa dependiente de ARN. Está compuesta por un dominio catalítico amino terminal y un dominio transmembrana carboxilo terminal que ancla la proteína a las membranas intracelulares (Lee *et al.*, 2004; Schmidt-Mende *et al.*, 2001). La estructura cristalina del dominio catalítico de NS5B

revela un plegamiento semejante a otras polimerasas con motivos de dedo, palma y pulgar, aunque presenta un sitio alostérico adicional para GTP (Bressanelli *et al.*, 1999).

1.5 EL CICLO INFECTIVO DEL HCV

El HCV se une a los hepatocitos a través de interacciones entre las glicoproteínas de la envoltura del virus y receptores celulares (Bartosch y Cosset, 2006; Cocquerel *et al.*, 2006) produciendo un complejo que es endocitado. El bajo pH de los endosomas desencadena cambios conformacionales en las glicoproteínas E1 y E2 dando lugar a la exposición del péptido de fusión y desencadenando la fusión entre la membrana viral y celular (Hsu *et al.*, 2003; Lavillette *et al.*, 2006). En este proceso de fusión el genoma viral es liberado de la nucleocápsida y traducido en el RE. La proteína NS4B induce la formación de redes membranosas que servirían como andamio para el complejo de replicación viral (Apple *et al.* 2006; Egger *et al.*, 2002; Gosert *et al.*, 2003). Tras la amplificación del genoma y la expresión de las proteínas virales, los viriones son ensamblados y liberados a través de un vía de secreción constitutiva de la célula diana. En la Figura 8 se muestra un modelo del ciclo infectivo del HCV propuesto por Alvisi y col. (2011).

1.5.1. MODELOS PARA EL ESTUDIO DEL CICLO VIRAL

Dada la baja eficacia del HCV para establecer una infección persistente *ex vivo* y a la baja disponibilidad del HCV procedente del suero de pacientes, el estudio del ciclo viral y la composición de los componentes moleculares de las partículas virales ha sido posible gracias a la aparición de sistemas eficientes *in vitro*, como la expresión de las glicoproteínas del HCV de forma recombinante, las partículas tipo HCV o VLPs ("Virus Like Particles") (Baumert *et al.*, 1998), el sistema del replicón (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999), las pseudopartículas del HCV o HCVpp (Bartosch *et al.*, 2003a; Hsu *et al.*, 2003) y el sistema para la producción de virus en cultivo o HCVcc (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

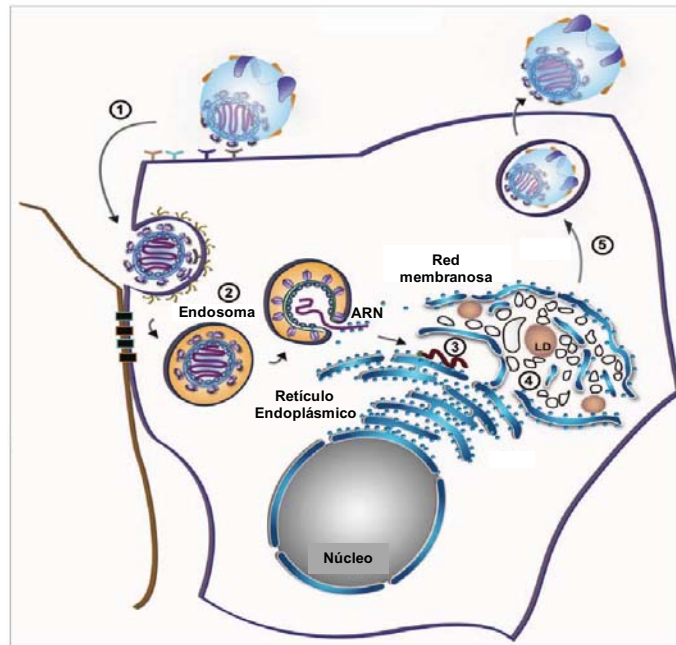


Figura 8. Modelo del ciclo infeccioso del HCV. (1) La partícula del HCV, a través de las glicoproteínas E1 y E2 de su envoltura y de su asociación con apolipoproteínas celulares, se une a una serie de receptores presentes en la superficie del hepatocito. (2) La endocitosis mediada por receptor del HCV da lugar a la internación dependiente de clatrina. El bajo pH del endosoma (indicado en naranja) podría desencadenar la fusión entre las membranas virales y celulares, liberando el genoma de ARN en el citoplasma. (3) La traducción del genoma viral ocurre en el RE rugoso dando lugar a una poliproteína precursora que es procesada por las proteasas virales y celulares. (4) La replicación del ARN tiene lugar en las redes membranosas, donde tendría lugar el ensamblaje del HCV. (5) La liberación del HCV se piensa que está ligada a la vía de secreción de VLDL (Adaptada de Alvisi *et al.*, 2011).

El empleo de las **glicoproteínas recombinantes** del HCV ha permitido la identificación de posibles receptores celulares, pero su uso se limita al estudio de su estructura y en ensayos de unión y endocitosis.

Las **VLPs** se generan mediante el autoensamblaje de las proteínas estructurales del virus, expresadas en células de insecto, en forma de partículas que no contienen genoma y no pueden replicar. Constituyen un modelo útil para ensayos de unión con la célula hospedadora.

Las **HCVpp** consisten en las glicoproteínas sin modificar de la envoltura del HCV ensambladas en partículas formadas por la proteína core de retrovirus o

lentivirus. La presencia de GFP ("Green Fluorescence Protein") o el gen marcador de la luciferasa empaquetado en las pseudopartículas permite la determinación rápida y fiable de la infectividad mediada por las glicoproteínas del HCV.

Los **replicones** surgieron para el estudio de la replicación viral. Los primeros replicones generados (Lohmann *et al.*, 1999) estaban constituidos por una cadena de ARN de doble hebra en la que los genes correspondientes a las proteínas estructurales se sustituyeron por un gen de resistencia a neomicina, y en la que se incluían las regiones no codificantes 5' y 3', necesarias para la replicación viral. Esta construcción recibe el nombre de replicón subgenómico. La identificación de mutaciones de adaptación al cultivo celular, que confieren una mayor capacidad de replicación al ARN viral, hizo posible la generación de replicones genómicos que contienen el genoma de la poliproteína completa (Pietschmann *et al.*, 2002).

El inconveniente del sistema anterior es que no produce virus infectivos, problema que fue resuelto con el descubrimiento de una cepa del genotipo 2a del HCV procedente del suero de un paciente con hepatitis fulminante, llamada JFH1, que es capaz de producir partículas virales infectivas o **HCVcc**, y que permiten el estudio del ciclo viral completo.

1.5.2. UNIÓN Y ENTRADA DEL HCV A LAS CÉLULAS DIANA

Con el fin de establecer una infección persistente en los hepatocitos, el HCV tiene que ser transferido desde el torrente sanguíneo a través del endotelio hepático hasta el hígado. El HCV puede atravesar el endotelio mediante transcitosis activa o bien por difusión pasiva a través de fenestraciones o poros en las células del endotelio hepático de unos 100-200 nm de diámetro (Daneker *et al.*, 1998), aunque el primer mecanismo es el más aceptado. Las lectinas tipo C, como L-SIGN y DC-SIGN, expresadas en las células sinusoidales y en las células dendríticas, respectivamente, son capaces de interaccionar con las glicoproteínas del HCV, capturar y transportar el HCV a los hepatocitos adyacentes (Cormier *et al.*, 2004a; Falkowska *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2004;). Además, el HCV puede atravesar el endotelio mediante su

asociación a lipoproteínas. Curiosamente, un estudio reciente sugiere que las células B ayudarían al HCV a atravesar la barrera endotelial del hígado (Stamataki *et al.*, 2009).

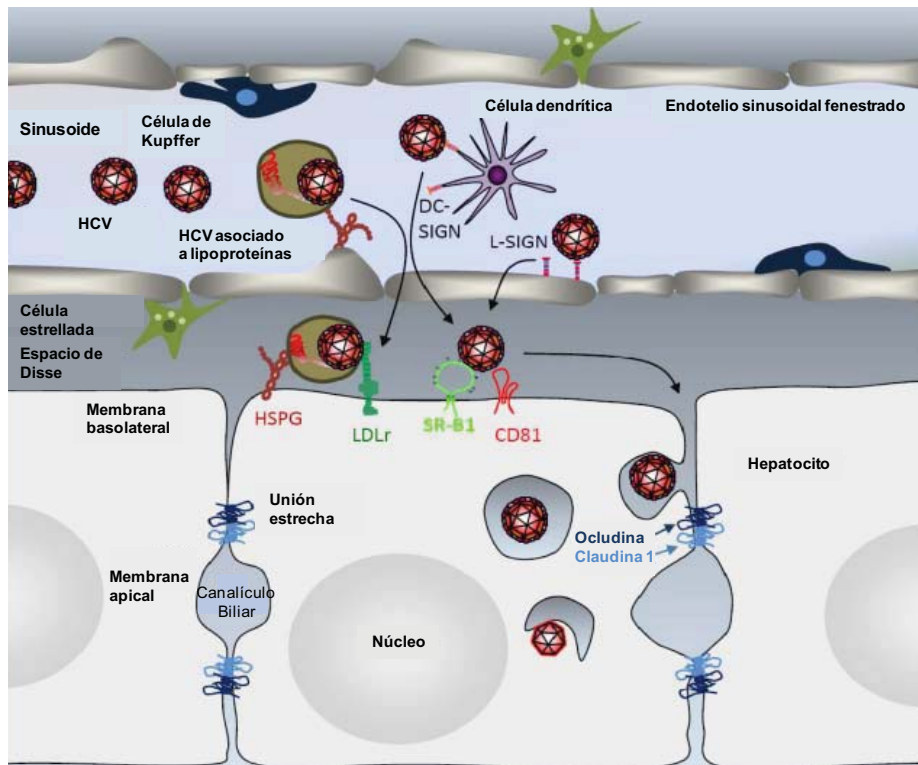


Figura 9. Entrada del HCV en el hígado y en la célula. El HCV circula libre en la sangre o asociado a lipoproteínas. Para atravesar el endotelio hepático y llegar al espacio de Disse, el virus difundiría a través del fenestrado o bien sería capturado y transendocitado por las lectinas de tipo C, L-SIGN y DC-SIGN, expresadas en la superficie del endotelio hepático y en las células dendríticas, respectivamente. Alternativamente, los proteoglicanos tipo heparán sulfato (HSPG) presentes en la superficie de las células endoteliales podrían favorecer la transferencia del virus libre o asociado con lipoproteínas en el hígado. En el hígado, el virus podría interaccionar inicialmente con HSPG y con el receptor de LDL (LDLr), tras lo cual se produciría su interacción con SRBI, CD81, Ocludina y Claudina1. (Adaptada de Bartosch y Dubuisson, 2010).

El proceso de infección comienza con la unión del virus a la superficie de sus células diana a través de las glicoproteínas de la envoltura viral. Como ocurre para muchos otros virus, los glicosaminoglicanos parecen ser los sitios de unión iniciales para el HCV (Barth *et al.*, 2010; Germi *et al.*, 2002). El hecho de

que el virus se encuentre asociado con LDLs o VLDLs en el suero permite proponer el receptor de LDL (LDLr) como candidato para la unión del virus a la célula (Agnello *et al.*, 1999; Monazanian *et al.*, 1999). A continuación, el virus interaccionaría con otros factores de entrada, como la tetraspanina CD81 y el receptor de lipoproteínas SRBI, así como con Claudina1 y Ocludina, dos factores de las uniones estrechas (Figura 9).

1.5.2.1. Receptores del HCV

➤ *Lectinas: DC-SIGN y L-SIGN*

Las lectinas DC-SIGN (del inglés “dendritic cell-specific intercelular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin”) y L-SIGN (DC-SIGN específica del nodo linfóide y del hígado) son proteínas de membrana homotetraméricas tipo II que pertenecen a la familia de las lectinas tipo C. Contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos en su región extracelular carboxilo terminal. L-SIGN y DC-SIGN se unen a E2 soluble con alta afinidad a través de los oligosacáridos tipo manosa, además de interaccionar con HCVpp (Lozach *et al.*, 2004; Pohlmann *et al.*, 2003) y con virus procedentes del suero de pacientes infectados (Gardner *et al.*, 2003). DC-SIGN se expresa en células de Kupffer, células dendríticas y linfocitos. L-SIGN se expresa en células endoteliales sinusoidales hepáticas. DC-SIGN y L-SIGN podrían funcionar como receptores capaces de capturar y transmitir el virus a células permisivas y, por tanto, jugar un papel en la iniciación de la infección y el tropismo tisular (Cormier *et al.*, 2004a; Gardner *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2004).

➤ *Glucosaminoglicanos (GAGs)*

Los GAGs son polisacáridos lineales expresados en la superficie celular que actúan como sitios de unión para muchos virus. Podrían servir como receptores primarios, de baja afinidad, aunque abundantes, implicados en la interacción inicial del virus con la superficie celular antes de su unión a receptores de alta afinidad (Barth *et al.*, 2003; Germi *et al.*, 2002). De hecho,

otros flavivirus como el virus del dengue tipo 2 y el virus de la fiebre amarilla, usan GAGs como receptores celulares (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002). Se ha observado que la conservación de residuos cargados positivamente en el extremo amino terminal de E2 estaría relacionada con la interacción con el heparán sulfato (HS), un GAG altamente sulfatado (Barth *et al.*, 2003). Sin embargo, el papel exacto de los GAGs en la entrada celular no está claro. La proteína E2 soluble se une a la heparina, un análogo de HS, con alta afinidad, aunque estudios realizados con HCVpp no confirman este hallazgo (Callens *et al.*, 2005). Estas observaciones sugieren que el sitio de unión a HS no estaría accesible en los complejos formados por E1E2 en la superficie de las HCVpp o que la unión a GAGs está mediada por las lipoproteínas asociadas a las partículas del HCV.

➤ *Receptor de LDL (LDLr)*

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) transporta partículas de lipoproteínas que contienen colesterol desde el medio extracelular al interior de las células. El ligando más importante para este receptor es LDL (lipoproteína de baja densidad), que contiene una única copia de la apolipoproteína B-100 en su superficie como componente proteico primario, y es el responsable del transporte de la mayoría del colesterol del plasma. Además, este receptor presenta alta afinidad por lipoproteínas que contienen múltiples copias de apolipoproteína E, como algunas formas de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) y ciertas lipoproteínas de densidad intermedia. El papel del LDLr en la entrada del HCV fue propuesto por primera vez por Agnello y col. (1999). Estos autores demostraron que las partículas del HCV asociadas a lipoproteínas procedentes del suero de pacientes y otros virus de la familia *Flaviviridae* utilizan el LDLr para entrar en la célula. Se aislaron las partículas virales asociadas a lipoproteínas o lipovirionpartículas (LVPs) del suero de pacientes y se demostró que infectaban células de hepatoma de manera dependiente de LDLr (André *et al.*, 2002). Aun así, la función del LDLr en la infección por el HCV sigue siendo controvertida, ya que no se ha demostrado el papel de este receptor en el modelo *in vitro* de HCVcc. Estudios más recientes han confirmado la importancia

de este receptor en la infección de hepatocitos humanos primarios (Molina *et al.*, 2007). Además existe una correlación entre la expresión de LDLr en la superficie de las células de pacientes con infección crónica y un alto título viral (Petit *et al.*, 2007).

➤ CD81

CD81 es una proteína de membrana no glicosilada, perteneciente a la familia de las tetraspaninas, que se expresa en la superficie de numerosos tipos celulares. Contiene cuatro dominios transmembrana, dos lazos extracelulares llamados SEL (lazo extracelular pequeño del inglés “Small Extracellular Loop”) y LEL (lazo extracelular grande del inglés “Large Extracellular Loop”), y dominios intracelulares amino y carboxilo terminales. El SEL (28 aminoácidos) es necesario para la expresión óptima en la superficie del LEL (Masciopinto *et al.*, 2001). El LEL (80 aminoácidos) se compone de 5 hélices α y contiene 4 residuos de Cys (Kitadokoro *et al.*, 2001) que forman dos puentes disulfuro. Su secuencia es variable, excepto entre humanos y chimpancés, las únicas dos especies permisivas a la infección por el HCV (Major *et al.*, 2004; Walker, 1997) (Figura 10).

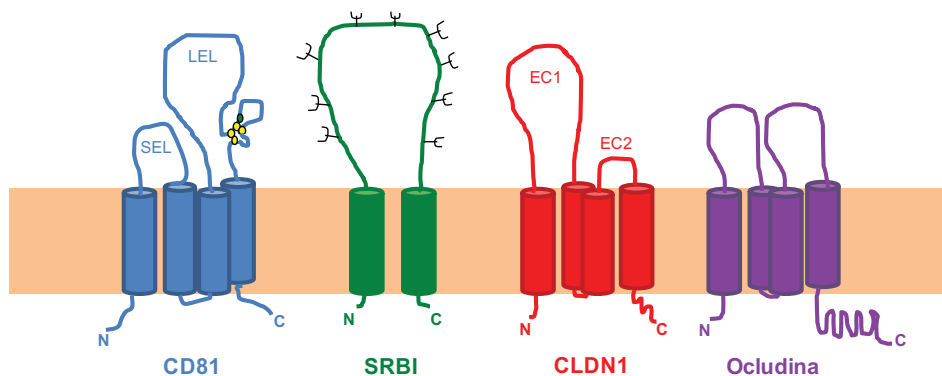


Figura 10. Representación esquemática de la topología de los receptores principales del HCV. En CD81 se representan en amarillo los residuos de Cys conservados implicados en la formación de dos puentes disulfuro y en verde un residuo de Gly muy conservado. Los sitios de glicosilación en SRBI se representan en negro.

Una característica importante de las tetraspaninas es que forman una red extendida en la superficie celular, donde interaccionan consigo mismas, con otras tetraspaninas y/o con integrinas. Esta red recibe el nombre de microdominios enriquecidos en tetraspaninas o TEMs, y están implicados en señalización celular, migración, adhesión, fusión, reorganización del citoesqueleto y proliferación.

CD81 fue propuesto como receptor del HCV con base en la unión de E2 soluble con el LEL de CD81 (Pileri *et al.*, 1998). La integridad de los dos puentes disulfuro es requerida para la interacción CD81-HCV (Petracca *et al.*, 2000), y el sitio de interacción parece implicar los residuos 163, 186, 188 y 196 de CD81 (Flint *et al.*, 1999; Meola *et al.*, 2000). Las regiones de E2 implicadas en la unión con CD81 son controvertidas. Se han identificado varios residuos no contiguos en E2 como importantes para la unión con CD81: Trp 420, los residuos 436-443, 527-535 y 613-618 (Drummer *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2006; Roccasecca *et al.*, 2003; Rothwangl *et al.*, 2008), que indican que la unión es conformacional y dependiente del correcto plegamiento de E2. Un estudio reciente en el que se realizan inserciones de 5 aminoácidos en distintas regiones de las glicoproteínas del HCV expresadas en la superficie de HCVpp, reveló que los residuos Trp 529, Gly 530 y Asp 535 son críticos para la unión con CD81 (Rychlowska *et al.*, 2011). Además el sitio de unión a CD81 parece ser específico de especie, ya que E2 soluble no se une a CD81 de ratón o de rata (Flint *et al.*, 2006).

Diversos estudios confirman la implicación de CD81 en la infección por el HCV. En líneas celulares de hepatoma humanas no permisivas a la infección por el HCV, como HepG2 y HH29, que no expresan CD81, tras la expresión ectópica del receptor se convierten en permisivas frente a la infección por HCVpp y HCVcc (Bartosch *et al.*, 2003b; Cormier *et al.*, 2004b; Lavillette *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CD81 y una forma soluble del LEL de CD81 inhiben la infectividad de HCVpp y HCVcc *in vitro* (Bartosch *et al.*, 2003a; Cormier *et al.*, 2004b; Hsu *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2008; Wakita *et al.*, 2005) y la infección del HCV *in vivo* (Meuleman *et al.*, 2008). El silenciamiento de la expresión de CD81 en hepatocitos primarios humanos y en células de hepatoma inhibe la infección por el HCV (Zhang *et al.*, 2004).

Varios estudios sugieren que CD81 actúa como una molécula de entrada tras la unión del virus. Anticuerpos específicos anti-CD81 y la forma recombinante del LEL de CD81 inhiben la infección por el HCV únicamente tras la unión del virus (Cormier *et al.*, 2004b; Flint *et al.*, 2006; Koutsoudakis *et al.*, 2006). Es más, la susceptibilidad a la infección por el HCV no depende sólo del nivel de expresión de CD81 (Akazawa *et al.*, 2007; Koutsoudakis *et al.*, 2007), sino también de las proporciones de CD81 y SRBI en la superficie celular (Kapadia *et al.*, 2007). EWI-2wint, una molécula que se asocia a CD81 expresado en la superficie celular, bloquea la entrada viral mediante la inhibición de la interacción del virus con CD81 (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). La ausencia de este inhibidor natural de CD81 en células hepáticas podría permitir la entrada viral y contribuir al hepatotropismo del HCV. La unión E2-CD81 juega un papel fundamental en la infectividad del HCV ya que da lugar a la relocalización dependiente de actina de los complejos E2/CD81 a las zonas de contacto célula-célula donde CD81 entra en contacto con Ocludina y Claudina1 (Brazzoli *et al.*, 2008). Un estudio reciente revela que CD81 prepara a E1E2 para la exposición al pH ácido del endosoma que da lugar a la fusión del virus con la célula (Sharma *et al.*, 2011).

➤ *SRBI (Receptor Scavenger clase B tipo I)*

SRBI es una glicoproteína de 57 kDa con dos dominios citosólicos amino y carboxilo terminales, separados por un dominio extracelular grande que presenta 9 sitios potenciales de N-glicosilación (Acton *et al.*, 1994; Calvo y Vega, 1993; Rhainds y Brissette, 2004) (Figura 10). Es un receptor de superficie altamente expresado en el hígado y en tejidos esteroideogénicos. Juega un papel fundamental en el metabolismo del colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) y regula el suministro de colesterol a los tejidos esteroideogénicos. SRBI media también la unión y transferencia de lípidos procedentes de diferentes clases de lipoproteínas (Krieger, 2001) y facilita el metabolismo de LDL, VLDL y lipoproteínas oxidadas o acetiladas (Van Eck *et al.*, 2008).

SRBI ha sido propuesto como receptor del HCV debido a su interacción con E2 soluble (Scarselli *et al.*, 2002). La región HVR-1 de E2 es la responsable

de la unión al lazo extracelular de SRBI, ya que su delección impide la interacción con el receptor, y reduce la infectividad de HCVpp (Bartosch *et al.*, 2003a; Scarselli *et al.*, 2002). Es más, el empleo de anticuerpos dirigidos frente a SRBI reduce significativamente la infectividad de HCVpp (Bartosch *et al.*, 2003b).

De modo similar a CD81, SRBI actúa como receptor tras la unión del virus. Así, anticuerpos dirigidos frente a estos dos receptores inhiben la infección cuando son añadidos tras 60 segundos de la unión del virus (Cormier *et al.*, 2004b; Zeisel *et al.*, 2007). El hecho de que HCVcc se una a células CHO que expresan SRBI en su superficie pero no células CHO que expresan CD81 (Evans *et al.*, 2007) podría implicar que fuera necesario un primer contacto con SRBI antes de que la partícula viral pueda interaccionar con CD81.

Curiosamente, HDL, el principal ligando de SRBI, facilita la entrada de HCVpp y HCVcc en la célula, aunque no hay evidencia de una interacción directa entre HDL y las partículas virales (Bartosch *et al.*, 2005; Dreux *et al.*, 2006; Voisset *et al.*, 2005). Se ha postulado que el efecto de HDL podría producirse a través de una interacción entre HDL y las membranas lipídicas o mediante la activación de SRBI por HDL. En cambio, otros ligandos naturales de SRBI, como VLDL (Maillard *et al.*, 2006) y LDL oxidadas (von Hahn *et al.*, 2006), tienen efectos inhibitorios en la entrada a través de SRBI de HCV procedente de sueros y HCVpp, respectivamente. SRBI podría actuar como proveedor de colesterol, regulando la organización de CD81 en la membrana e impulsando la permisividad de las células a la infección por el HCV.

Gracias al establecimiento de ensayos de transcomplementación funcionales, en los que la entrada del HCV es restaurada gracias a la expresión ectópica de SRBI, ha sido posible demostrar que SRBI y su actividad de transferencia de lípidos fisiológica son necesarios para la entrada del HCV (Dreux *et al.*, 2009; Ploss *et al.*, 2009).

➤ *Las proteínas de las uniones estrechas: Claudina1 y Ocludina*

Las moléculas Claudina1 y Ocludina forman parte de las denominadas uniones estrechas, complejos de adhesión célula-célula que separan las membranas apicales y basolaterales, y mantienen la polaridad celular formando

una membrana interna, lo que permite la difusión de ciertas moléculas y limita la de otras (Shin *et al.*, 2006). Las glicoproteínas del HCV promueven alteraciones en la localización y en la funcionalidad de las proteínas de las uniones estrechas (Benedicto *et al.*, 2008), lo que proporciona nueva información acerca de los daños celulares producidos por la infección del HCV, como la colestasis, caracterizada por la disminución o interrupción del flujo de bilis, que está asociada a la alteración funcional de las uniones estrechas.

Claudina1 (CLDN1). Evans y col. (2007) identificaron CLDN1 como correceptor del HCV. La CLDN1 se expresa en tejidos epiteliales aunque predominantemente en el hígado, formando redes en las uniones estrechas (Furuse *et al.*, 1998). Consta de 211 aminoácidos, con dos lazos extracelulares, 4 segmentos transmembrana y 3 dominios intracelulares (Van Itallie y Anderson, 2006) (Figura 10). El dominio altamente conservado en el primer lazo extracelular parece estar implicado en la entrada del HCV (Evans *et al.*, 2007). La expresión de CLDN1 confiere susceptibilidad a la infección por HCVpp en líneas celulares no hepáticas como HEK 293T y SW13, mientras que su silenciamiento inhibe la infección del HCV en células susceptibles (Evans *et al.*, 2007). Estudios funcionales indican que este receptor participa en una etapa post-unión de la infección, a continuación de la unión del HCV a CD81 y SRBI (Evans *et al.*, 2007). Mediante analogías con otros virus (Coyne y Bergelson, 2006), se cree que las interacciones con CLDN1 tiene lugar tras la migración lateral del complejo HCV/SRBI/CD81 a las uniones estrechas. La distribución de la CLDN1 en las uniones estrechas se correlaciona con la permisividad a la infección por el HCV (Liu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008), lo que confirma que la localización de CLDN1 en las uniones estrechas es importante para la entrada viral y el hepatotropismo del HCV. Diversos estudios han demostrado que existe una asociación directa CLDN1-CD81 (Cukierman *et al.*, 2009; Farquhar *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), sugiriendo un papel para dichos complejos en la entrada del virus.

En una reciente publicación se ha descrito que un péptido de 18 aminoácidos de CLDN1 correspondiente a la región intracelular y la primera región transmembrana del receptor, es capaz de inhibir la infección por el HCV

en una etapa post-unión (Si *et al.*, 2012). Además, la sobreexpresión de este péptido da lugar a la interacción con las glicoproteínas del HCV.

Ocludina. Recientemente se ha descrito que otro de los componentes de las uniones estrechas, la Ocludina, juega un papel importante en la entrada del HCV y en la producción de una infección productiva por el virus (Liu *et al.*, 2009). La Ocludina es una proteína de 60 kDa con 4 regiones transmembrana, dos lazos extracelulares y regiones citosólicas amino y carboxilo terminales (Furuse *et al.*, 1993) (Figura 10).

El silenciamiento de los genes que codifican CLDN1 y Ocludina da lugar a la inhibición de la entrada de HCVpp y HCVcc (Liu *et al.*, 2009). Los pasos iniciales de unión del HCV no se ven afectados por el silenciamiento del gen de la Ocludina sugiriendo que ésta juega un papel importante en etapas tardías del proceso de entrada (Benedicto *et al.*, 2009). Análisis de microscopía confocal muestran que la Ocludina se acumula en el RE y que colocaliza con la proteína E2 del HCV (Benedicto *et al.*, 2008). Esta asociación E2-Ocludina ha sido confirmada por co-inmunoprecipitación (Benedicto *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). También se ha demostrado que la Ocludina humana posibilita la infección del HCV en células de ratón (Ploss *et al.*, 2009). En conjunto, estos datos sugieren que la Ocludina interacciona directamente con E2, facilitando la entrada del virus a través de las uniones estrechas de los hepatocitos. Además, la delección del segundo lazo extracelular de Ocludina anula la capacidad de las HCVpp para entrar en las células, así como su capacidad para inmunoprecipitar con E2 (Liu *et al.*, 2010). Sin embargo, esta región expresada de manera recombinante no es capaz de unirse a E2 soluble (Liu *et al.*, 2010)

En un sentido opuesto a lo anteriormente descrito, varios estudios han demostrado que los receptores Claudina1 y Ocludina podrían suponer una barrera frente a la infección por el HCV cuando están formando parte de las uniones estrechas. Así, por ejemplo, en estudios con partículas de HCV fluorescentes, se observa que la internación ocurre fuera de las zonas de contacto célula-célula (Coller *et al.*, 2009). Es más, mutantes de CLDN1 y Ocludina que carecen de dominios importantes para su localización y correcta funcionalidad en las uniones estrechas, son capaces de hacer que las células

sean susceptibles a la infección por el HCV (Evans *et al.*, 2007; Cuckierman *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

➤ *Receptor de colesterol Niemann-Pick C1-tipo 1 (NPC1L1)*

Recientemente se ha publicado la implicación del receptor de colesterol NPC1L1 en la entrada del HCV (Sainz *et al.*, 2012). NPC1L1 posee 13 dominios transmembrana y se expresa en la superficie apical de enterocitos intestinales y hepatocitos humanos, incluyendo las células Huh7, siendo responsable de la absorción de colesterol por las células y de la homeostasis de colesterol de todo el cuerpo (Altmann *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2008). La dependencia de la infección del HCV con el colesterol, llevó a Sainz y col. (2012) a pensar que otro receptor de colesterol, además de LDLr y SRBI, como NPC1L1, jugase un papel en la entrada del HCV. Así, estos autores han demostrado no sólo que la expresión de NPC1L1 es necesaria para la infección por el HCV, sino que además, el ezetimibe, un antagonista de NPC1L1 (García-Calvo *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2002), bloquea la infección por la mayoría de los genotipos del HCV *in vitro* e *in vivo*, retrasando el establecimiento de la infección del genotipo 1b del HCV en ratones con injertos de hígado humano.

1.5.2.2. Endocitosis

Tras la interacción con los receptores celulares, el virus es enviado a los endosomas tempranos, donde tiene lugar la fusión entre la membrana viral y celular. Distintos estudios señalan que la internación del HCV en los hepatocitos es dependiente de la endocitosis mediada por clatrina (Blanchard *et al.*, 2006; Codran *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006).

La información disponible acerca del papel del tráfico de receptores en la entrada del HCV es limitada. Diversos estudios sugieren la participación de distintos receptores o complejos de receptores en la internación del virus. Por ejemplo, Schwarz y col. (2009) han demostrado que los contactos celulares modulan los niveles de expresión de SRBI y CLDN1 y promueven la internación del HCV. Mediante la sobreexpresión de estos receptores por separado se

comprobó que SRBI pero no CLDN1, era capaz de incrementar la velocidad de internación de HCVpp y HCVcc, lo que sugiere la participación de SRBI en la internación del virus. Liu y col. (2010) demostraron que la Ocludina forma complejos con Dinamina II, una GTPasa importante para la endocitosis, de manera dependiente del segundo lazo extracelular. Tanto la infección por HCVcc como por HCVpp son sensibles a la inhibición o silenciamiento de la Dinamina, por lo que se ha sugerido que la Ocludina podría actuar como puente entre el HCV y las maquinarias de endocitosis mediadas por Dinamina. Un estudio reciente sugiere también la participación del complejo CD81-CLDN1 en la internación del HCV (Farquhar *et al.*, 2012).

1.5.3. FUSIÓN

Tras la unión y endocitosis del HCV, la nucleocápsida del virus es liberada en el citoplasma de la célula como resultado del proceso de fusión entre las membranas virales y celulares. La fusión ocurre en los endosomas y es dependiente del pH ácido de este compartimento (Blanchard *et al.*, 2006; Codran *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Meetens *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006). Las glicoproteínas de HCV son las responsables de la fusión, ya que en ensayos *in vitro* con HCVpp o HCVcc y liposomas, la fusión sólo tiene lugar en presencia de E1 y E2 (Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2006). En este sentido se han descrito dos tipos de proteínas de fusión (I y II) (Lescar *et al.*, 2001). Las proteínas de fusión tipo I se caracterizan por formar proyecciones puntiagudas en la superficie del virión y por presentar una estructura mayoritariamente helicoidal. Su maduración requiere un corte proteolítico que libera su péptido de fusión amino terminal. En cambio, las proteínas de fusión tipo II se encuentran casi planas con respecto a la superficie del virión y presentan un alto contenido en lámina β . Este tipo de proteínas se ordenan en tres dominios distintos (DI a DIII) y forman dímeros orientados cabeza-cola. Contienen un péptido fusogénico interno que se inserta en forma de lazo en la membrana. La proteína de fusión no sufre un corte proteolítico, pero sí su proteína acompañante. Los flavivirus entran en sus células diana mediante endocitosis mediada por receptor y usan proteínas de fusión tipo II (Lindenbach y Rice, 2001). Basándose en potenciales homologías

estructurales con estas proteínas, se ha propuesto que la proteína E2 del HCV es una proteína de fusión tipo II (Yagnik *et al.*, 2000), siendo E1 la proteína acompañante. El modelo del plegamiento de E2 de acuerdo con las características descritas para las proteínas de fusión tipo II propuesto por Krey y col. (2010) (Figura 7), ha permitido proponer un segmento candidato a péptido de fusión en E2 comprendiendo los residuos 502 a 520. Sin embargo, existe controversia en cuanto a la identidad de los péptidos de fusión y de la proteína que los porta. Así, el análisis del perfil de hidrofobicidad interfacial de la proteína E2 revela la existencia de tres regiones con tendencia a interactuar con membranas (residuos 430 a 449, 543 a 560 y 603 a 624). De hecho, los péptidos sintéticos correspondientes a estas regiones presentan propiedades desestabilizantes de membranas (Pacheco *et al.*, 2006). No obstante, otros autores han identificado otra serie de regiones de E1 y E2, que podrían estar implicadas en la fusión. Lavillette y col. (2007) propusieron las regiones 270-284 de E1 y 416-430 y 600-620 de E2; Pérez-Berná *y col.* (2006) propusieron la región de E1 265-296; Russell y col. (2009) propusieron la región 262-290 de E1.

Además de los péptidos fusogénicos, existen otras regiones implicadas en la fusión, tal y como se ha descrito para otras proteínas de fusión de tipo II. Así, la región *stem* de E2 (residuos 652-715) podría estar implicada en la reorganización de los complejos de glicoproteínas que tienen lugar durante la fusión (Albecka *et al.*, 2011). Mediante barridos de reemplazamiento de residuos de Trp, se ha determinado que los dominios transmembrana de ambas glicoproteínas parecen estar implicados en el proceso de fusión (Ciczora *et al.*, 2007).

La falta de datos estructurales acerca de estas glicoproteínas hace más complicado el estudio del mecanismo de fusión y la determinación de los péptidos de fusión. En la Figura 11 se muestra un mecanismo de fusión propuesto para las proteínas de fusión tipo II, que podría ser similar al mecanismo seguido por el HCV. Durante la fusión, las proteínas de fusión tipo II, que forman heterodímeros con la proteína acompañante, se disocian tras la exposición a bajo pH, dando lugar a la exposición de las regiones fusogénicas. Los monómeros se reorientan verticalmente, insertando los péptidos fusogénicos en la membrana diana y formando homotrímeros que se pliegan dando lugar a

una estructura en horquilla, que permite la fusión entre las membranas virales y celulares.

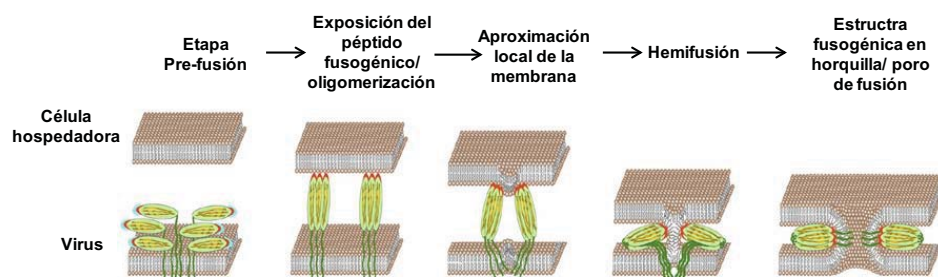


Figura 11. Modelo de fusión propuesto para proteínas de fusión de clase II. En las proteínas de fusión de tipo II, los péptidos fusogénicos hidrofóbicos surgen de una estructura conteniendo láminas β . Tras la activación fusogénica, y el cambio de heterodímeros a homotrimeros (no mostrado), los péptidos fusogénicos son expuestos y se insertan en la membrana opuesta. La interacción entre distintos dominios de la proteína da lugar a la fusión con la membrana celular (Kielian y Rey, 2006). (Adaptada de Sapir *et al.*, 2008).

Por otro lado, los lípidos también juegan un papel importante en el proceso de fusión. La presencia de colesterol en las membranas diana aumenta la fusión (Lavillette *et al.*, 2006), y su ausencia inhibe la infección por el HCV (Kapadia *et al.*, 2007). De la misma manera, la eliminación del colesterol de la membrana viral da lugar a una infectividad muy baja (Aizaki *et al.*, 2008). Curiosamente, la esfingomieline tiene un gran efecto potenciador de la fusión del HCV cuando las membranas diana presentan colesterol (Haid *et al.*, 2009), y la presencia de este lípido en la membrana viral juega un papel fundamental en la infectividad del HCV (Aizaki *et al.*, 2008).

1.5.4. REPLICACIÓN

La replicación del HCV se lleva a cabo en unas estructuras vesiculares denominadas redes membranosas (Figura 12), cuya formación parece ser inducida por la proteína NS4B (Egger *et al.*, 2002; Gretton *et al.*, 2005). Las redes membranosas derivan de las membranas del RE (Bartenschlager *et al.*, 2004), y son ricas en colesterol y ácido grasos cuyo grado de saturación modula

la replicación del HCV (Kapadia y Chisari, 2005). Varios estudios han identificado varios cofactores celulares para la replicación del HCV (Randall *et al.*, 2007; Reiss *et al.*, 2011; Tai *et al.*, 2009). Entre estos factores, la PI4KIII α (Fosfatidil Inositol 4 Quinasa III α), una quinasa lipídica de la ruta de secreción temprana, juega un papel fundamental en la replicación del HCV (Berger *et al.*, 2009; Reiss *et al.*, 2011; Trotard *et al.*, 2009). La ausencia de actividad de esta enzima induce cambios drásticos en la morfología ultraestructural de las redes membranosas del HCV. GFB-1, un factor de intercambio de guanina para GTPasa pequeñas de la familia Arf, es otro factor celular crítico para la replicación del HCV que podría participar en la ultraestructura de la red membranosa (Goueslain *et al.*, 2010). Además, se ha propuesto que los microtúbulos y los filamentos de actina proporcionan las pistas para el movimiento del complejo de replicación del HCV a otras regiones de la célula, a través de interacciones moleculares con NS3 y NS5A (Lai *et al.*, 2008).

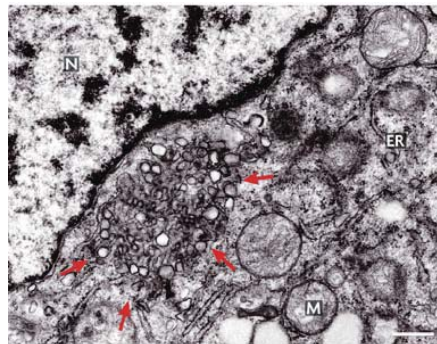


Figura 12. Imagen de una red membranosa en una célula Huh7 infectada con un replicón subgenómico. La red membranosa se indica mediante flechas rojas. La barra de escala representa 500 nm. ER, retículo endoplásmico; M, mitocondria; N, núcleo. (Moradpour *et al.*, 2007).

Appel y col. (2006) propusieron un modelo de replicación del HCV. Tras la infección y liberación del ARN viral en el citoplasma, las proteínas del HCV se generan a través de la traducción del genoma mediada por el IRES. Dicho proceso tiene lugar en el RE rugoso donde la peptidasa señal y las proteasas virales catalizan la proteólisis de la poliproteína. La formación de vesículas, que se acumulan para formar la red membranosa, es inducida por NS4B junto con

factores celulares y virales (NS5A). Posteriormente, NS5B, junto con factores virales adicionales (NS3/4A, NS5A), y factores celulares, se ensambla al extremo 3' de la cadena de ARN positivo con el fin de iniciar la síntesis *de novo*. La nueva cadena de ARN negativo generada sirve como molde para producir un exceso de cadenas de ARN positivo, que será utilizado para la traducción, para nuevas rondas de replicación, o para ser empaquetado en partículas virales.

1.5.5. ENSAMBLAJE VIRAL Y LIBERACIÓN

El proceso de ensamblaje viral se puede dividir en dos pasos: (1) formación de la nucleocápsida y (2) formación de la envoltura e incorporación lipídica (Bartenschlager *et al.*, 2011).

Paso 1. El dominio DI de la proteína del core está implicado en la interacción con el ARN viral y en la oligomerización, por lo que constituye un prerrequisito para el ensamblaje de la nucleocápsida (Klein *et al.*, 2004, 2005; Kunkel *et al.*, 2001; Majeau *et al.*, 2004). Se ha determinado que el dominio D2 de core le proporciona su capacidad para localizarse en los LDs (Boulant *et al.*, 2006; Hope *et al.*, 2002). Un segundo determinante para la asociación core-LD es la secuencia carboxilo terminal de core, que permite la proteína E1 se dirija al retículo endoplásmico. La proteína del core induce la recolocación de los LDs de una distribución dispersa en el citosol a una región perinuclear (Boulant *et al.*, 2008). El ARN viral es replicado en las redes membranosas, localizadas en la región perinuclear, y la redistribución de los LDs podría crear el entorno lipídico necesario en el que los elementos estructurales y no estructurales implicados en el ensamblaje podrían interaccionar (Miyazari *et al.*, 2007).

Paso 2. Varios estudios han demostrado que la maduración y liberación de las partículas del HCV están estrechamente relacionadas con la vía de VLDL (Chang *et al.*, 2007; Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Jiang y Luo, 2009). La formación de la envoltura e incorporación lipídica del HCV podría tener lugar en unos microdominios especializados y ricos en lípidos en la membrana del RE, enriquecidos por LDs y en los que se sintetizan los LDs lumbales, que son los precursores de las VLDL. Durante el ensamblaje la nucleocápsida puede ser introducida en el núcleo de los LDs lumbales. No se sabe con certeza cómo

las proteínas de la envoltura se dirigen a los sitios de ensamblaje y se incorporan en los viriones. Se asume que NS2 solo, o junto con p7, establece interacciones con el complejo de replicación y las proteínas de la envoltura (Phan *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). Dos estudios recientes demuestran que NS2 podría poner en contacto las proteínas de la envoltura, p7 y las proteínas no estructurales NS3 y NS5A (Jirasko *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011). El proceso por el que las apolipoproteínas se incorporan a las partículas maduras no se conoce. Estas partículas, conteniendo ApoB y ApoE, serían transportadas siguiendo la ruta de secreción de VLDL.

Popescu y col. (2011) proponen un modelo para el ensamblaje del HCV empleando los datos obtenidos con el sistema de HCVcc, que se describe en la Figura 13.

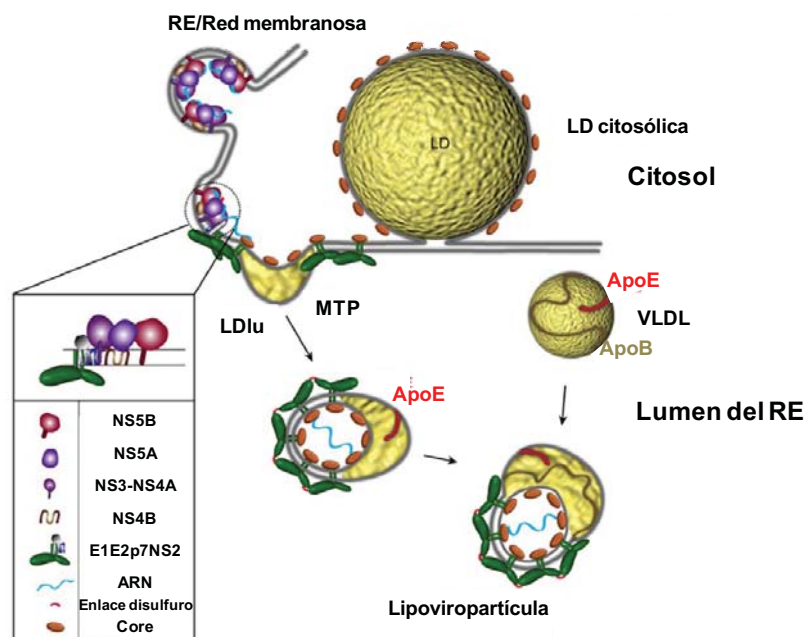


Figura 13. Modelo de ensamblaje del HCV. El ensamblaje viral es el resultado del encuentro de tres módulos: core, el complejo E1E2p7NS2 y el complejo de replicación. El ensamblaje ocurriría en el entorno creado por los LDs y el RE. La fuerza conductora del ensamblaje viral vendría de tres direcciones: la fuerza de empuje de la nucleocápsida naciente, la fuerza de empuje de las proteínas de la envoltura que podría estabilizar la arquitectura de la superficie viral mediante puentes disulfuro intermoleculares y la fuerza de los LDs lumbinales nacientes (LDlu) entre las dos caras del RE. El resultado es una lipoviripartícula híbrida, que adquiere ApoE aparentemente a través de su componente lipídico. MTP: proteína transferidora de triglicéridos microsomal, implicada en la vía de VLDL. (Adaptada de Popescu *et al.*, 2011).

1.6. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN

Tras la infección aguda por el HCV, aproximadamente el 20% de las personas infectadas es capaz de eliminar espontáneamente la infección (Afdhal, 2004). Los mecanismos exactos para la eliminación del virus no se conocen, pero parece que múltiples componentes del sistema inmune, tanto innato como adaptativo juegan un papel fundamental en este proceso.

Para muchos virus se ha demostrado que la respuesta inmune innata, y más notablemente los interferones tipo 1 (IFN1) son la primera línea de defensa limitante de la replicación y la expansión viral, y contribuyen a la resolución de una infección como aguda o crónica (Haller y Weber, 2007). Dada la importancia de esta defensa, los virus han desarrollado numerosas estrategias para contrarrestarla, incluyendo el bloqueo de la inducción de IFNs, la interferencia con señales desencadenadas por IFNs o la inhibición de la acción de genes estimulados por interferones (ISGs) (Haller y Weber, 2007). En el caso del HCV, se ha demostrado que la proteasa NS3/4A corta proteolíticamente dos moléculas clave para la inducción de la transcripción de ISGs: MAVS, una proteína adaptadora que transmite la señal desde el sensor de ARN RIG-I hasta el factor de transcripción IRF-3; y TRIF, un adaptador requerido para la señalización desde el sensor de ARN receptor tipo toll (TLR)-3 hasta IRF-3 (Li *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005). Por ello, las células infectadas por el HCV no son capaces de producir IFN1. Otro mecanismo adicional por el cual el HCV podría atenuar la respuesta inmune innata es el bloqueo de la traducción del ARN a través de ARN de doble cadena activado por la proteína quinasa R (PKR) (Garaigorta y Chisari, 2009). Estudios recientes han identificado un grupo de polimorfismos asociados al gen que codifica IFN- γ (o IL-28B) en el hospedador que es importante para la determinación de la eliminación espontánea del virus durante la infección aguda y en la respuesta frente a la terapia estándar IFN/ribavirina (Ge *et al.*, 2009; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009), aunque el mecanismo por el cual el IFN- γ actúa en el ciclo del HCV no ha sido todavía dilucidado.

La mayoría de estudios realizados hasta el momento señalan que las células T CD4⁺ y CD8⁺ tienen papeles cruciales aunque distintos en la determinación del resultado de la infección por el HCV (Diepolder *et al.*, 1995; Lechner *et al.*, 2000, Thimme *et al.*, 2001). Las células T CD8⁺ son las células efectoras primarias que median la inmunidad frente al HCV, mientras que las células T CD4⁺ participan en el control a largo plazo del virus y son requeridas para el mantenimiento de la función de las células T CD8⁺ (Klenerman *et al.*, 2005; Shoukry *et al.*, 2003). Durante la infección aguda se detectan respuestas inmunes adaptativas fuertes y amplias que persisten en los pacientes que resuelven la infección. En cambio, en los pacientes con infección persistente la respuesta específica de células T frente al virus es débil o indetectable. Estudios inmunogenéticos han demostrado una asociación entre diferentes alelos HLA de clases I y II y la eliminación del virus (Mckiernan *et al.*, 2004; Neumann-Haefelin *et al.*, 2007). Además estudios realizados con pacientes con infección crónica demuestran que la respuesta de las células T CD4⁺ y CD8⁺ está impedida (Bowen *et al.*, 2005; Lauer *et al.*, 2004) (Figura 14).

Los anticuerpos circulantes frente al HCV son detectables hasta 1 a 3 meses después de la infección (Schmilovitz-Weiss *et al.*, 1993) y parecen ser un componente importante en el control del virus en las primeras etapas de la infección. Existe una correlación directa entre la eliminación del virus durante la fase aguda y la rápida inducción de elevados títulos de anticuerpos circulantes neutralizantes (Pestka *et al.*, 2007). Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes también se encuentran en altos títulos en los pacientes crónicos, y en este caso obviamente no son capaces de controlar la infección (Bartosch *et al.*, 2003c). Las proteínas de la envoltura, que son los principales objetivos de los anticuerpos neutralizantes, presentan los mayores niveles de variabilidad genética del virus, lo que permite al virus la evasión de anticuerpos neutralizantes (von Hahn *et al.*, 2007). Hay otros mecanismos por los cuales el HCV evade la respuesta inmune humoral como la transferencia directa del virus mediante contactos célula-célula (Timpe *et al.*, 2008), la inducción de anticuerpos que interfieren con los anticuerpos neutralizantes (von Hahn *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009), y la protección de los epítomos neutralizantes por glicosilación de determinados residuos de las proteínas de la envoltura (Helle *et al.*, 2007).

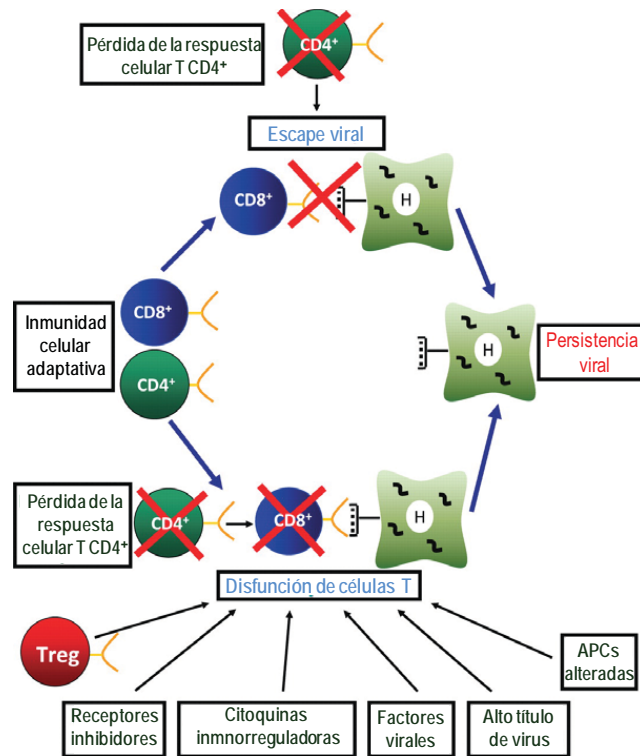


Figura 14. Posible mecanismo usado por el HCV para evadir la respuesta inmune adaptativa. El HCV necesita evadir la respuesta inmune adaptativa para establecer la persistencia viral, lo que puede ocurrir por dos mecanismos. El primer mecanismo podría ocurrir a través de mutaciones de escape viral en los epítomos MHC clase I, permitiendo al virus escapar del reconocimiento por las células T CD8+. Las mutaciones de escape están relacionadas con la pérdida de respuesta de células T CD4+. El segundo mecanismo es un impedimento de la funcionalidad de células T específicas del virus que no pueden controlar la replicación del virus. La pérdida de funcionalidad de las células T CD4+ podría contribuir a la disfuncionalidad de las células HCV-específicas T CD8+. (Adaptada de Jo *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

La implicación de las proteínas de la envoltura del HCV en las primeras etapas de la infección ha supuesto que dichas proteínas se hayan convertido en una posible diana para el diseño de fármacos y vacunas frente al virus, especialmente en el caso de E2, ya que constituye el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes generados frente al HCV. Por ello, sería de gran utilidad el conocimiento de la estructura tridimensional de estas proteínas, reto complicado que no se ha conseguido hasta la fecha.

Precisamente la falta de información acerca de la estructura tridimensional de las glicoproteínas de la envoltura del HCV ha dificultado el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales se produce la fusión entre las membranas virales y celulares, así como la determinación de la proteína fusogénica del virus y la posición de los péptidos fusogénicos en la misma. El conocimiento de este proceso permitiría el diseño de inhibidores específicos y sería una terapia muy eficaz contra el virus. Por analogía con otros virus de la misma familia que el HCV o de otras familias estrechamente relacionadas, se ha especulado que la proteína fusogénica del HCV es E2. Con el fin de contribuir a la elucidación del mecanismo fusogénico del HCV el **primer objetivo** de este trabajo ha consistido en la localización de posibles regiones fusogénicas en la glicoproteína E2, mediante la obtención y caracterización estructural y funcional de distintos mutantes derivados de la forma truncada de E2, E2₆₆₁, en los que se delecionaron distintas regiones hidrofóbicas potencialmente fusogénicas.

La proteína E2₆₆₁ recombinante producida en el sistema de baculovirus presenta tendencia a formar oligómeros que podrían afectar a su función y dificultar su cristalización. La reciente determinación del patrón de puentes disulfuro del ectodominio de la glicoproteína E2, ha permitido observar la existencia de un residuo de Cys en la proteína recombinante posiblemente implicado en la formación de puentes disulfuro intercatenarios. Por ello, el **segundo objetivo** ha consistido en la obtención de un mutante en el que dicha Cys sea sustituida por una Ser, para estudiar la implicación de esta Cys en el estado de oligomerización y en las propiedades estructurales y funcionales de la proteína.

Por otro lado, diversos estudios señalan que la presencia de E1 es necesaria para el correcto plegamiento de E2, actuando como chaperona. Con el fin de determinar la veracidad de esta hipótesis, el **tercer objetivo** planteado ha sido la obtención de una proteína E2₆₆₁ soluble cuyo plegamiento en el interior celular ha tenido lugar en presencia de E1, así como su caracterización estructural y funcional, en relación con la proteína E2₆₆₁ plegada en ausencia de E1.

Por último, se planteó como **cuarto objetivo** el estudio del papel de E2₆₆₁ en la unión y entrada del virus en la célula, completando así la caracterización funcional de dicha proteína, y permitiendo determinar la idoneidad del uso de esta proteína como herramienta en el diseño de vacunas frente al HCV. Para ello, se realizaron ensayos de unión y colocalización con algunos de los receptores del virus en los hepatocitos, inhibición de distintas rutas de endocitosis de la célula así como ensayos de bloqueo de la infección de HCVpp en células de hepatoma humanas Huh7.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES

3.1. MICROORGANISMOS

3.1.1. CEPAS DE *E. coli*

- **DH5αF'**: F' *endA1 hsdR17(r-k,m⁺k) supE44λ-thi-1recA1gyrA(Nal^r)relA1Δ(lacZY A-argF)* U169 *deoR* [φ80 *dlac* Δ(*lacZ*) M15]. Cepa utilizada para la clonación de los distintos ADNs codificantes. Permite la comprobación de colonias azules/blancas en placas que contienen X-galactosa.
- **BL21 (DE3)**: F- *ompT* [*lon*] *hsdSB* (r⁻_b m⁻_b) *gal dcm* con DE3, profago λ que contiene el gen de la ARN polimerasa del fago T7. Cepa deficiente en las proteasas *lon* y *ompT*.

3.1.2. LÍNEAS CELULARES DE INSECTO

- **Sf9**: esta línea celular deriva de las células IPLB-Sf21-AE de *Spodoptera frugiperda*. Las células Sf9 se adaptan al cultivo en suspensión en medio libre de proteínas Insect X-press para la expresión transitoria o mantenida de proteína recombinante. Estas células poseen las siguientes características:
 - El tiempo de duplicación varía de 18 a 30 horas hasta una densidad máxima de 8-12×10⁶ células/ml en medio Insect X-press.
 - Pueden ser utilizadas directamente en un cultivo en suspensión para la propagación de baculovirus y producción de proteínas recombinantes, aunque también pueden ser usadas en un cultivo en monocapa para cotransfección o ensayos en placa para la purificación de baculovirus recombinantes.
- **High Five o Tni**: las células High Five (BTI-TN-5B1-4) derivan de la línea celular parental de *Trichoplusia ni* (Tni). Estas células son comúnmente utilizadas para la obtención de proteínas recombinantes cuando se usa el sistema de expresión basado en baculovirus. Además, al igual que las Sf9, pueden crecer en medio Insect X-press en cultivos en monocapa, aunque su crecimiento y mantenimiento

no son tan eficientes en cultivos en suspensión como en el caso de las células Sf9.

Ambas líneas celulares se cultivaron en monocapa a 27 °C utilizando el medio Insect X-press (BioWhittaker) con gentamicina a 50 µg/ml.

3.1.3. LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO

- **Huh7**: línea celular derivada de hepatoma humano cedida por la Dra. Catherine Schuster del Instituto de Virología de Estrasburgo (Francia). Es una línea celular inmortal de células tumorigénicas tipo epiteliales. Estas células son receptivas a la infección por algunos virus, como el Virus de la Hepatitis C (HCV) y han sido usadas como modelo para estudiar la interacción del HCV con los hepatocitos.
- **CHO**: línea celular derivada de células de ovario de Hamster chino cedida por el Dr. Arvind Patel del Centro para la Investigación de Virus de Glasgow (Escocia). Son las células más usadas para la transfección, expresión y producción a gran escala de proteínas recombinantes.
- **HEK 293T**: línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano. Son muy fáciles de transfectar y de crecer en cultivo. Contienen el antígeno grande T de SV40 (del inglés “Simian Vacuolating Virus 40”; virus 40 vacuolado del simio), lo que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados conteniendo el origen de replicación de SV40, dando lugar a su amplificación y a la expresión temporal extendida de los productos génicos deseados.

Todas estas células son mantenidas en monocapa a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% y con un 98% de humedad.

3.2. VECTORES PLASMÍDICOS

3.2.1. PLÁSMIDOS PARA LA MANIPULACIÓN DEL ADN

- **pCR2.1®** (Invitrogen). Vector utilizado para la subclonación de productos de PCR, junto con el kit TOPO® TA. Plásmido linealizado con un residuo de timina protuberante en 3'. Los fragmentos de PCR producidos por la ADN-polimerasa

Taq presentan una adenosina protuberante en 5', lo que permite la ligación eficiente con el vector. El sitio de clonación está en medio del gen de la enzima β -galactosidasa, por lo que los clones recombinantes pueden ser identificados en una placa de LB con X-galactosa, sustrato que da color azul tras su hidrólisis por la enzima, cuya expresión es inducida por IPTG. Además, posee el gen de la enzima β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina.

3.2.2. PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli*

- **pGEX-2T-LEL-CD81.** Este vector codifica una proteína de fusión carboxi-terminal con GST (Glutation S-Transferasa). Existe un sitio de corte por trombina entre la proteína de interés (LEL-CD81) y GST, que permite eliminar la GST. Fue cedido amablemente por el Dr. Arvind H. Patel del Centro para la Investigación de Virus de Glasgow (Escocia).

3.2.3. PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *BACULOVIRUS*

- **pAcGP67-A** (Pharmingen): este plásmido contiene la secuencia señal gp67 tras el sitio múltiple de clonaje, de tal forma que el gen de interés puede ser insertado en uno de los sitios de clonación y la proteína codificada por dicho gen será expresada, como proteína de fusión conteniendo el péptido señal gp67, bajo el control del promotor fuerte del gen de la polihedrina. Este péptido media la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular, siendo eliminado en el proceso de transporte de la proteína hacia el exterior de la célula. Así, la proteína es fácilmente purificada a partir del medio de cultivo cuando éste no contiene proteínas adicionales.

3.2.4. PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES EN CÉLULAS HEK 293T

- **pMLV-Gag-Pol:** vector que permite expresar proteínas de estructura retroviral bajo el control del promotor CMV (Citomegalovirus). Los genes *gag* y *pol* del virus de la leucemia de ratón, MLV (del inglés “Murine Leukemia Virus”) codifican las proteínas de la cápsida, y la transcriptasa inversa y la integrasa, respectivamente.

- **pMLV-Luc:** vector que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor CMV que permite determinar la actividad transcripcional en las células que son transfectadas con este vector.

La construcción de estos dos vectores ha sido descrita previamente (Bartosch *et al.*, 2003a). Ambos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr. François-Loïc Cosset de la Escuela Normal Superior de Lyon (ENSL, Lyon, Francia).

- **phCMV-G:** vector que contiene el gen que codifica la proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular o VSV, bajo el promotor CMV. Se usa en vectores de sistemas de expresión lentiviral para introducir material genético en sistemas *in vitro* o en modelos animales debido a su amplio tropismo.

- **pLNCX-CD81:** vector para la expresión en mamíferos. Posee el gen que codifica para el receptor celular CD81 bajo el promotor de CMV y resistencia a ampicilina y neomicina.

Estos dos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr. Arvind H. Patel del Centro para la Investigación de Virus de Glasgow (Escocia).

- **pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen):** vector diseñado para la expresión en células de mamífero. Contiene el promotor potenciador (CMV) para la expresión en altos niveles, y el origen de SV40 para la replicación episomal y el rescate de vectores simples en líneas celulares que expresan el antígeno grande T. Posee el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación pUC para la selección y mantenimiento en *E. coli*.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

3.3.1. MEDIOS DE CULTIVO DE *E. coli*

- **LB** (1 L): 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro sódico. Para el crecimiento de las células en medio sólido se añadió agar a 15 g/L.

3.3.2. MEDIOS DE CULTIVO DE *BACULOVIRUS*

- **MEDIO INSECT X-PRESS** (BioWhittaker): Medio enriquecido con L-glutamina y carente de proteínas. Es utilizado para el crecimiento y mantenimiento de células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) y de *Trichoplusia ni* (Tni), así como para la producción a gran escala de proteína recombinante. Permite el cultivo celular en suspensión y en monocapa.

3.3.3. MEDIOS DE CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

- **DMEM**: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Las células Huh7 fueron crecidas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 µg/ml de gentamicina, 1 mM de piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 2 mM de L-glutamina. Las células HEK 293T fueron crecidas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, y 2 mM de L-glutamina.
- **HAM F12**: medio rico en piruvato de sodio. Se ha usado para el cultivo de las células CHO suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales.

3.4. DISOLUCIONES DE USO GENERAL

- **PBS** (tampón fosfato salino): NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.4.
- **PBST**: tampón PBS con Tween 20 al 0.05% (v/v).

- **PBSF:** tampón PBS con suero fetal bovino al 2% (v/v).
- **TAE:** Tris-acetato 0.04 M (4.84 g/L de Tris base y 1.14 ml/L de ácido acético glacial), EDTA 1 mM, pH 8.0.
- **Tampón de aplicación 6x** (electroforesis de ADN): azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).
- **Tampón para geles de poliacrilamida:** Tris 0.025 M, pH 8.3, Gly 0.192 M y SDS 0.1% (p/v).
- **Tampón de electrotransferencia de proteínas:** Tris 48 mM, pH 9.0, Gly 39 mM, SDS 0.037% (p/v) y metanol 20% (v/v).
- **Tampón de aplicación 1x** (electroforesis de proteínas): Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v).
- **Tampones para la preparación de bacterias competentes:**
 - a) **TfB1:** RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15% (p/v), pH 5.8.
 - b) **TfB2:** Mops 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15% (p/v), pH 6.8.
- **Medium buffer:** Tris 5 mM, ácido cítrico 5 mM, MES 5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0.1 M.
- **Tampones de cotransfección de células de insecto Sf9:**
 - a) **Tampón de transfección A** (Pharmingen): Medio Grace suplementado con un 10% de suero fetal bovino a pH 6.0-6.2.
 - b) **Tampón de transfección B** (Pharmingen): Tampón Hepes, pH 7.1, CaCl₂ 125mM y NaCl 140 mM.

4. MÉTODOS

4.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR COMUNES

4.1.1. Amplificación de ADN por PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer). En todos los casos se utilizaron 50 µl de una

mezcla de reacción conteniendo: dNTPs (10 μ M cada uno), cebadores (1 μ M cada uno), la enzima ADN-polimerasa *Vent* (New England Biolabs) junto con su tampón comercial y el ADN molde. En el caso de que la ADN polimerasa utilizada fuera la Taq Gold, la cual añade una base de desoxiadenosina en los extremos del fragmento amplificado, se añadió a la mezcla de reacción MgCl_2 2.5 mM y el tampón correspondiente para la enzima. En cada caso se ha utilizado el programa de PCR adecuado para obtener el producto deseado atendiendo a las temperaturas de desnaturalización de los cebadores y a la longitud de los fragmentos de ADN a amplificar.

4.1.2. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa se preparan al 0.7-2% (p/v), según sean los tamaños del ADN a separar, en tampón TAE. A las muestras se les añade la cantidad necesaria de tampón de aplicación 6x. En todos los casos se utilizan patrones de masa molecular de diferentes tamaños (patrón “REAL” de REAL-Durviz). Las electroforesis se desarrollan a un voltaje constante de 80-100 V, siendo su duración variable dependiendo del tamaño del ADN. Los geles de agarosa se tiñen con una disolución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml), y se observan bajo luz ultravioleta.

4.1.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo con el sistema de extracción Wizard® PCR preps de Promega, siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante.

4.1.4. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones de plásmidos y fragmentos de ADN se llevaron a cabo mediante incubación durante 2 h a 37 °C, en el tampón específico para cada enzima y utilizando ocasionalmente BSA (1 mg/ml).

4.1.5. LIGACIONES

Para conseguir la inserción del ADN codificante de interés en el vector de clonación adecuado se utilizó la ligasa T4 (Fermentas). Así, las ligaciones se realizan tomando 2 µl de la ligasa, 2 µl de tampón 10x, cantidades variables de inserto y plásmido dependiendo de sus concentraciones relativas, completando hasta 20 µl finales con agua autoclavada. La mezcla final se incubaba a 17 °C durante 12-18 horas.

4.1.6. SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación de los distintos ADNs codificantes en los plásmidos recombinantes se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando tanto oligonucleótidos comerciales complementarios de las regiones que flanquean los insertos como los diseñados en cada caso y provistos por Sigma.

4.2. MANIPULACIÓN DE ADN PLASMÍDICO BACTERIANO

4.2.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

Las bacterias competentes, utilizadas para las pertinentes transformaciones, fueron preparadas siguiendo el protocolo que se especifica a continuación:

- 1) Se crece una colonia fresca en 5 ml de ψ -Broth a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.3.
- 2) Se inoculan 100 ml de ψ -Broth a 37 °C con los 5 ml del preinóculo. Se crecen en Erlenmeyer de 250 ml a 37 °C y con fuerte agitación, hasta lograr una OD₆₀₀ de 0.48, transvasándose a hielo.
- 3) Las células se centrifugan a 4 °C, 2500 rpm, durante 20 minutos. A partir de este punto se trabaja a 4 °C.
- 4) El sedimento de células se seca bien con una torunda estéril o con una centrifugación adicional.

- 5) El sedimento de células bien seco se resuspende completamente en Tfb1 a 4 °C. Se usan 30 ml por cada 100 ml de cultivo original.
- 6) Se centrifuga durante 20 minutos, a 4 °C y a 2500 rpm.
- 7) El sedimento se vuelve a resuspender en 4 ml de Tfb2 a 4 °C por cada 100 ml de cultivo original.
- 8) Finalmente las células se distribuyen en alícuotas de 0.2 ml en tubos estériles y fríos. Se conservan a -80 °C.

4.2.2. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

El protocolo de transformación utilizado fue el siguiente:

- 1) Se descongelan células competentes y se pasan a hielo.
- 2) Se toma una alícuota de 200 µl de células competentes por transformación y se incuba con el ADN plasmídico durante 15 minutos en hielo. Se pasan las células momentáneamente a temperatura ambiente y se someten a un choque térmico por incubación a 37 °C durante 4 minutos.
- 3) Tras enfriar durante 1-2 minutos en hielo, se añaden 800 µl de medio ψ-Broth y se dejan incubando a 37 °C durante al menos 1 h.
- 4) Finalmente se plaquean diferentes volúmenes (desde 50 µl hasta la totalidad de las células empleadas) en placas de LB con el antibiótico adecuado para la selección.

4.2.3. "MINIS" DE COLONIAS

Este método, suministrado por el Dr. José Luis García López, permite analizar el tamaño de un ADN plasmídico por extracción a partir de un sedimento bacteriano y posterior electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó para comprobar el tamaño de los plásmidos de las diferentes ligaciones. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se toman células de la placa utilizando un palillo o punta estéril y se transvasan a un tubo eppendorf que contiene 40 µl de tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 7.4-8.0, EDTA 10 mM, NaOH 0.1 M, SDS 1%).

- 2) Se añaden 3 μ l de HCl 1M para neutralizar y 5 μ l de tampón de aplicación (6x) de geles de agarosa. Se incuba a -80 °C durante un mínimo de 15 min. En este paso el SDS precipita y arrastra el ADN cromosómico.
- 3) Se centrifuga en microfuga a 4 °C durante 8 min, manteniendo los tubos en hielo tras la centrifugación.
- 4) Se aplican 20 μ l del sobrenadante en un gel de agarosa al 0.7%.

4.2.4. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Una vez seleccionados los plásmidos recombinantes, se procedió a obtenerlos con un alto grado de pureza utilizando el sistema de purificación GenElute™ Plasmid Miniprep Kit de Sigma o QIAprep spin miniprep kit de QIAGEN, siguiendo, en ambos casos, las indicaciones del fabricante. El grado de pureza del ADN plasmídico se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

4.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.3.1. EXPRESIÓN EN *E. coli*

A partir de una colonia fresca de la estirpe de *E. coli* que contenga el plásmido recombinante, se crece un precultivo con 2 ml de medio LB con el antibiótico de selección a 100 μ g/ml. El cultivo bacteriano se incuba a 37 °C, con agitación orbital a 250 rpm durante 16 h. Pasado este tiempo el cultivo llega a la fase de saturación. Posteriormente, se coge el volumen necesario de precultivo para que, al llevarlo a un cultivo de entre 50-400 ml de medio LB con el antibiótico de selección a 100 μ g/ml, se tenga una OD₆₀₀ de 0.1. El cultivo bacteriano se incuba a 37 °C, con agitación orbital a 250 rpm, hasta que alcance una OD₆₀₀ de 0.5. A continuación, la expresión de proteína recombinante es inducida por adición de IPTG 0.4-0.5 mM al medio de cultivo a 37 °C, con agitación orbital a 250 rpm durante el tiempo indicado en cada caso.

Tras la inducción, el cultivo se centrifuga a 4 °C en las condiciones que se indiquen. El sedimento celular se resuspende en el volumen que se indique en

tampón conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF (fluoruro de fenilmetil-sulfonilo) 1 mM, leupeptina 10 µg/ml y aprotinina 10 µg/ml por litro de cultivo inicial. A continuación, las células se lisan mediante sonicación. El sobrenadante y el sedimento del lisado celular (fracciones soluble e insoluble, respectivamente) se separan por centrifugación para analizarlos mediante electroforesis.

4.3.2. EXPRESIÓN EN *Baculovirus*

En la Figura 15 se recoge un esquema del proceso seguido para la expresión de proteínas utilizando el sistema de expresión de baculovirus.

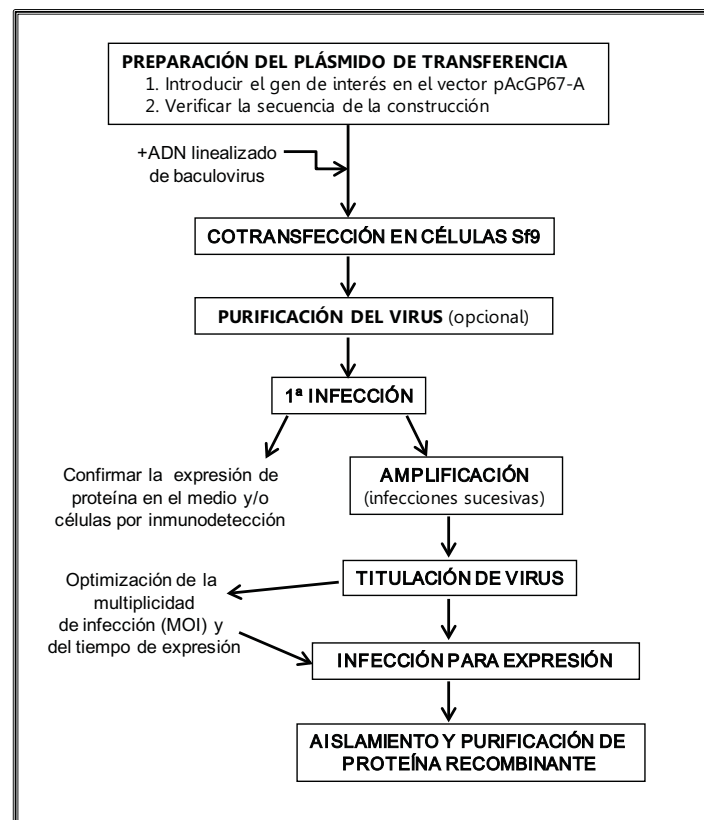


Figura 15. Guía esquemática de trabajo para la expresión de proteínas recombinantes con el sistema de baculovirus.

La ligación de fragmentos de ADN en el plásmido pAcGP67-A y la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α F' se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente, seleccionando los plásmidos recombinantes en placas de LB/ampicilina (100 μ g/ml).

4.3.2.1. GENERACIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES POR COTRANSFECCIÓN

Con el fin de conseguir baculovirus recombinantes se realiza la cotransfección de células Sf9 con el plásmido pAcGP67-A, que contiene el gen de interés insertado, junto al ADN del virus linealizado, de manera que la recombinación homóloga *in vivo* entre el plásmido y el ADN viral transferirá el gen de interés al genoma viral. Para ello se sigue el protocolo de transfección BD BaculoGold:

- 1) Se siembran 2×10^6 células Sf9 en una placa de cultivos de 60 mm. Inicialmente la confluencia del cultivo debe ser de un 50-70%.
- 2) El cultivo celular se mantiene durante 1-2 horas a 27 °C para permitir la adhesión de las células a la superficie de la placa de cultivo.
- 3) Se retira el medio de cultivo de la placa y se añade 1 ml del tampón de transfección A, de tal forma que toda la superficie de la placa quede cubierta completamente por dicho tampón para evitar que se sequen las células.
- 4) Se mezclan 0.5 μ g del genoma de baculovirus linealizado BD BaculoGold y 2 μ g de plásmido recombinante con el gen de interés insertado en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml. El ADN de baculovirus linealizado BaculoGold™ es una forma modificada del ADN de baculovirus AcNPV (virus de la polyhedrosis nuclear *Autographa californica*). Este ADN contiene una mutación letal que previene la formación de virus viables excepto en el caso de que se produzca la recombinación homóloga con el plásmido pAcGP67-A que elimina dicha delección.
- 5) La mezcla se deja incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Se añade a la mezcla de transfección 1 ml del tampón de transfección B y se agita con la pipeta.

- 7) Se añade 1 ml de la mezcla anterior sobre el cultivo de células Sf9 gota a gota agitando la placa suavemente para permitir la mezcla de la nueva disolución con el tampón de transfección A.
- 8) El cultivo celular es incubado a 27 °C durante 4 horas.
- 9) Se retira la mezcla de transfección de la placa y se lavan las células con 2 ml de medio de cultivo. Seguidamente se vuelven a añadir 2 ml de medio Insect X-press y se incuba la placa a 27 °C durante 5 días.
- 10) El sobrenadante resultante de la cotransfección puede ser utilizado para amplificar o purificar los virus recombinantes generados en el proceso.

4.3.2.2. ENSAYO EN PLACA

Este método es válido tanto para la purificación como para la titulación de un virus. Mediante la purificación de los baculovirus recombinantes se consigue aislar un único tipo de virus de una mezcla heterogénea inicial. La titulación de un virus permite conocer la cantidad necesaria de virus para utilizarlo posteriormente, bien para amplificarlo o para producir la proteína recombinante de interés. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- 1) Se siembran 2×10^6 de células Sf9 en placas de 60 mm (70-80% de confluencia).
- 2) Después de 1-2 horas a 27 °C las células quedan adheridas a la superficie de la placa.
- 3) Se realizan diluciones seriadas (10^{-4} - 10^{-7}) del sobrenadante de la cotransfección y, tras retirar el medio, se añaden 0.5 ml de cada dilución sobre el cultivo celular. Las placas se incuban 1 hora a 27 °C, agitando suavemente cada 10 minutos.
- 4) Mientras tanto, se prepara agarosa, Agarplaque™ de Pharmingen, al 2% (p/v) en agua. La mezcla se autoclava para esterilizarla y disolver la agarosa completamente.
- 5) La disolución de agarosa se mezcla con el medio Insect X-Press en relación 1:1 y todo ello se atempera a 37 °C.
- 6) Se retira el sobrenadante de las placas y se cubren con 2 ml de la agarosa al 1% (p/v), añadiéndola cuidadosamente por la pared de la

placa. La agarosa solidifica en unos 15-20 min. De esta forma las células quedan inmovilizadas y se evita que la progenie viral se propague a través del medio, infectando a otras células. Una vez solidificada la agarosa, se cubren los pocillos con medio de cultivo y las placas se incuban a 27 °C durante 5 días.

- 7) Transcurrido dicho tiempo de incubación, se retira el medio y se añade 1 ml de una disolución del colorante rojo neutro diluido al 0.03% (p/v) en PBS, pH 7.4. Este colorante tiñe exclusivamente células vivas, de manera que las placas virales se detectan como manchas blancas sobre fondo rojo. Las placas se incuban durante 4 h a 27 °C. Tras este tiempo, se retira el colorante y se incuban invertidas en la oscuridad durante, aproximadamente, 24 h.
- 8) Una vez que las placas se han secado completamente, se pueden observar los halos de lisis, cada uno de los cuales corresponderá a un único tipo de virus.
- 9) Con una pipeta pasteur se sustrae la región de la agarosa donde se encuentra el halo de lisis, y por tanto, también el virus. El fragmento de agarosa es llevado a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se mezcla con 0.5 ml de medio Insect X-press.
- 10) Finalmente se deja que el virus difunda de la agarosa al medio durante 24 horas a 4 °C, tras lo cual los 0.5 ml de medio pueden ser utilizados para amplificar el baculovirus recombinante purificado.

En el caso de la determinación del título de un virus, se procede a contar los halos de lisis en el pocillo en que éstos se encontraron más claramente diferenciados. Cada grupo de células infectadas o halo de lisis es llamado placa. El número de unidades formadoras de placa (Pfu) por ml de inóculo es:

$$\text{Pfu/ml} = \frac{\text{Número de placas}}{\text{V(ml)} \times \text{factor de dilución}}$$

siendo V el volumen (ml) utilizado para infectar por el factor de dilución. La obtención de un título superior a 10^7 es suficiente para utilizar dicho inóculo para la producción de proteína recombinante.

Debido a que el sistema BaculoGold™ permite obtener más del 99% de baculovirus recombinantes de toda la población viral, generalmente no es necesario purificar los virus obtenidos tras la cotransfección. No obstante, si se observa una reducción en la producción de proteína recombinante tras múltiples pases del virus, es conveniente aislar una población clonal viral por purificación en placa.

4.3.3.3. AMPLIFICACIÓN DE *BACULOVIRUS* RECOMBINANTES

Después de la cotransfección o de la purificación de virus, los baculovirus recombinantes deben ser amplificados para obtener un elevado título de virus que permita la adecuada infección de las células de insecto y la expresión de proteína recombinante en dichas células. Con este fin, se siembran 2×10^6 células de insecto Tni por cada 25 cm² de placa de cultivo, y se incuban 2 h a 27 °C para permitir la adhesión de las células a las placas de cultivo. Las células deben estar al 70% de confluencia y deben ser infectadas con una multiplicidad de infección o MOI (cantidad de virus inoculado por célula del cultivo celular) no superior a 1. El empleo de un MOI mayor de 1 para la amplificación de un virus implica un aumento del número de virus con mutaciones extensivas en su genoma. Las células se incuban con 1 ml de medio conteniendo el virus por cada 25 cm² de placa de cultivo durante 5 días a 27 °C, después de haber estado agitando suavemente la placa cada 10 minutos durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se añade medio Insect X-press a las células, hasta completar 5 ml por cada 25 cm² de superficie. Transcurridos los 5 días de infección, la suspensión se centrifuga 15 min a 1500 r.p.m. y el sobrenadante se utiliza para una segunda ronda de amplificación.

Suelen realizarse dos o tres rondas de amplificación para obtener un elevado título de partículas virales (2×10^8 pfu/ml), suficiente para una infección a gran escala, una vez determinadas las condiciones ideales de MOI y tiempo de infección, que permita la expresión de la proteína recombinante de interés.

4.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXTENSIÓN DE HISTIDINAS

La purificación de proteínas con una extensión de seis histidinas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad empleando la resina Ni-ácido nitrilotriacético-agarosa (Ni-NTA-agarosa). De esta forma se dispone de un método rápido de purificación en un solo paso (Hochuli *et al.*, 1987).

La unión de la proteína a la resina se produce a través de los seis residuos de histidina presentes en el extremo amino o carboxilo terminal de la proteína. Se produce una interacción entre los anillos imidazólicos de los residuos de histidina y los iones Ni^{2+} . El ácido nitrilotriacético es el que queda unido a la resina. La capacidad de unión de la resina de Ni-NTA-agarosa es de 5-10 mg de proteína por ml. Las proteínas que contienen una extensión de seis histidinas se unen a la resina de Ni-NTA con una afinidad muy elevada ($K_d = 10^{-13}$ M a pH 8.0). Por ello, las proteínas contaminantes, que se unen inespecíficamente, pueden ser eliminadas fácilmente lavando la columna con disoluciones que contengan imidazol a concentraciones entre 10 y 50 mM. Además, la unión de proteínas con extensiones de seis histidinas no requiere una estructura determinada, por lo que no se ve afectada por la presencia de agentes desnaturalizantes como urea o cloruro de guanidinio, de detergentes no iónicos o de concentraciones elevadas de sal (0.1-1.0 M).

En líneas generales el proceso de purificación es el siguiente: la muestra a purificar se aplica en una columna de Ni-NTA-agarosa equilibrada en el tampón de carga a pH neutro o ligeramente básico, manteniendo un flujo de 1 ml/min. La columna se lava con el tampón de carga con imidazol 10 mM y, a continuación, con este mismo tampón con imidazol 20 mM, hasta que la absorción a 280 nm sea inferior a 0.05. La proteína unida específicamente a la columna se eluye con imidazol 200 mM, recogándose fracciones de 1 ml.

4.4.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS EN *TRICHOPLUSIA NI*

Con objeto de purificar las diferentes proteínas recombinantes utilizando el sistema de expresión basado en baculovirus, aproximadamente 150×10^6 células

(280 ml de medio de cultivo) son infectadas por el virus recombinante con un MOI de 5 a 10. Tras incubar las células con el virus durante 5 días a 27 °C, el medio de cultivo se recoge y centrifuga durante 15 min a 1500 rpm en rotor GS3. A continuación, los 280 ml son dializados frente a tampón Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM. Finalmente, el volumen total se carga en una columna con 2 ml de Ni-NTA agarosa, previamente equilibrada en el mismo tampón de diálisis y se procede tal y como se indica en el apartado de purificación de proteínas con una extensión de histidinas.

4.5. PURIFICACIÓN DE LEL-CD81- GST

El sistema de fusión génica con Glutathione S-Transferasa (GST) es un sistema integrado para la expresión, purificación y detección de proteínas de fusión producidas en *E. coli*.

La expresión y purificación del LEL de CD81 fusionado a GST se realizó a partir del plásmido pGEX-2T-LEL-CD81, como ya ha sido descrito previamente (Higgingbottom *et al.*, 2000). Brevemente, el plásmido anterior es transformado en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. Para ello, los clones se crecieron 12-16 h a 37 °C en agitación en 5 ml de medio selectivo (LB con ampicilina 100 µg/ml). A continuación, se añadió 1 ml del preinóculo en 400 ml de medio selectivo fresco y se dejó crecer hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4-0.6. En ese momento se induce la expresión de la proteína de fusión, añadiendo IPTG hasta una concentración final de 0.4 mM y se incuba 2 h a 37 °C.

A partir de aquí los siguientes pasos se realizan a 4 °C. El cultivo se centrifuga a 5000 rpm durante 20 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en PBS con inhibidores de proteasas (PMSF (fluoruro de fenilmetil-sulfonilo) 1 mM, leupeptina 10 µg/ml y aprotinina 10 µg/ml). La suspensión se somete a dos ciclos de congelación en hielo seco/descongelación a 37 °C y se sonica a 4 °C y a baja potencia. Se incuba 30 min con Triton X-100 a una concentración final del 1% (v/v) con agitación suave. A continuación se centrifuga 30 min a 5000 rpm. El sobrenadante resultante contiene las proteínas solubles, entre las cuales se encuentra, de modo mayoritario, la proteína de fusión expresada. Esta fracción soluble se incuba 16 h a 4 °C con la resina

Glutation Sefarosa (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) en agitación suave. Una vez unida la proteína de fusión a la resina, se lava la resina varias veces en PBST, y se eluye con Glutation reducido 20 mM. Se recogen fracciones de 1 ml. La pureza de la proteína obtenida se analiza mediante electroforesis PAGE-SDS seguida de tinción con Azul de Coomassie.

La concentración proteica se determinó por colorimetría empleando el reactivo de Ensayos de Proteínas Coomassie Plus (Thermo Scientific Pierce), utilizando BSA para establecer una recta patrón.

4.6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis de proteínas se llevaron a cabo en un sistema discontinuo siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). La polimerización de los geles y el desarrollo de la electroforesis se llevaron a cabo en un sistema Mini-Protean III o IV de BioRad. Se usaron geles de 0.75 o 1 mm de espesor, 7 cm de alto y 9 cm de ancho, empleándose sistemas de 10 ó 15 pocillos, según el ensayo concreto a realizar.

El gel separador se preparó con un 15% de acrilamida (excepto cuando se indica otro porcentaje) y bisacrilamida al 0.5% en Tris 0.38 M, pH 8.8 y SDS 0.1% (p/v).

El gel superior o concentrante, se preparó al 4% de acrilamida en tampón Tris 0.12 M, pH 6.8 con SDS al 0.1%.

Para la polimerización de los geles se añaden disoluciones de persulfato amónico al 0.02% (p/v) como agente catalizador y N,N,N',N' tetrametiletildiamina (TEMED) al 0.075% como propagador de la reacción. Las muestras se disolvieron en tampón de aplicación de electroforesis, que contiene SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v), Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, β -mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v) como indicador de la migración (Laemmli, 1970), y se calentaron a 95 °C durante 10 min. Las electroforesis se desarrollaron a temperatura ambiente en tampón Tris 0.025 M pH 8.3, glicocola 0.192 M con SDS al 0.1% (p/v) y a 25 mA por gel hasta que el marcador llegó al final del gel. Finalizada la electroforesis las proteínas se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant

Blue R-250 0.3% (p/v), metanol 45% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)). El exceso de colorante se eliminó mediante una disolución de ácido acético al 7.5% (v/v) y metanol al 20% (v/v).

La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el software Quantity one (Bio-Rad).

4.7. INMUNODETECCIÓN

El procedimiento de transferencia de gel a membrana de nitrocelulosa es el siguiente:

- 1) Sobre la placa que corresponde al polo positivo de un electrotransferidor Multiphor (LKB) se colocan tres capas de papel de filtro Whatman, seguidas de una membrana de nitrocelulosa (Amersham). Por encima de ésta se coloca el gel de poliacrilamida que contiene las proteínas que se desea transferir. Finalmente, se colocan sobre el gel otras tres capas de papel de filtro Whatman. Tanto los papeles de filtro como la membrana de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida son previamente empapados en el tampón de transferencia.
- 2) Se coloca la placa correspondiente al polo negativo y se ajustan los parámetros de voltaje, amperaje y tiempo. Las proteínas son transferidas durante 1 h, a 0.9 mA/cm² y 200 voltios.

4.7.1. DETECCIÓN DE LA EXTENSIÓN DE HISTIDINAS

- 1) Terminada la transferencia, la membrana, que contiene las proteínas en su superficie, es incubada durante 30 min en PBS con leche en polvo al 5%, con agitación y a temperatura ambiente.
- 2) A continuación se lleva a cabo la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-6His (Sigma) conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1:3000 en PBS-leche en polvo 0.1 % (p/v) durante 16 h a 4 °C.
- 3) Tras tres lavados de 10 min con PBS-Tween 20 al 0.1% (v/v), la membrana se revela mediante ECL (del inglés "Enhanced

Chemiluminiscence”) (Amersham Pharmacia Biotech), tal y como indica el fabricante.

4.7.2. DETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-E2 y ANTI-E1

En este caso, tras la incubación durante 30 min en PBS con leche en polvo al 5%, la membrana se incuba durante 16 horas a 4 °C con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (1:1000) (Austral Biologicals), con un policlonal anti-E2 (1:3000) de conejo (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007), con un anticuerpo policlonal anti E2 (1:500) de cabra (US Biologicals) o con un anticuerpo monoclonal anti-E1, A4 (1:1000, anticuerpo cedido amablemente por el Dr. Jean Dubuisson del Instituto Pasteur de Lille, Francia). Posteriormente, tras los correspondientes lavados, la membrana se incuba durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón (1:3000), anti-IgG de conejo (1:3000), o anti-IgG de cabra producido en conejo (1:3000), respectivamente, conjugados con HRP. El revelado se realiza mediante el método ECL.

4.8. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

4.8.1. ELISA CON SUEROS DE PACIENTES

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Costar de 96 pocillos, fondo plano y alta capacidad de unión, realizándose cada uno de ellos por duplicado. El protocolo seguido se describe a continuación:

- 1) Los correspondientes pocillos de la placa se tapizan con 0.1 µg de proteína recombinante durante 16 h a 4 °C.
- 2) Cada pocillo es lavado 4 veces con PBS/Tween 20 al 0.5% (v/v).
- 3) Se tapizan los pocillos con PBS/Tween 20 al 0.1% (v/v)/leche en polvo al 3% (p/v) durante 1 h a 37 °C.
- 4) Los sueros ensayados se diluyen entre 100 y 500 veces en la disolución anterior y se incuban durante 2 h a 37 °C.
- 5) Se realizan cuatro lavados con PBS /Tween 20 al 0.5% (v/v).

- 6) Se añade el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP (1:10000) (Sigma) en PBS/Tween 20 al 0.05% (v/v)/leche en polvo 1.5% (p/v) y se incuba durante 1 h a 37 °C.
- 7) Se realizan cuatro lavados con PBS/Tween 20 al 0.5% (v/v).
- 8) Finalmente se realiza el revelado utilizando 0.63 mg OPD (o-fenilendiamina, Merck) por ml y 1.6 µl de H₂O₂ al 30%/ml disueltos en tampón citrato 0.1 M, pH 5.0, metanol 4% (v/v). La reacción se detiene con H₂SO₄ 3 N.
- 9) Leer A₄₉₂ o A_{490 nm}.

Los sueros de pacientes infectados por el HCV fueron suministrados por el Dr. Fernando Vivanco de la Fundación Jiménez Díaz.

4.8.2. ELISA CON H53

Este ensayo se realiza siguiendo el protocolo indicado en el apartado anterior, con las salvedades de que se tapizan los pocillos con 1 µg de proteína recombinante, el anticuerpo primario empleado es H53 (anticuerpo monoclonal conformacional proporcionado amablemente por el Dr. Jean Dubuisson del Instituto Pasteur de Lille, Francia), a una dilución 1:400, y como anticuerpo secundario se ha empleado un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón (Sigma) a una dilución 1:3000.

4.8.3. ELISA DE UNIÓN DE E2 A CD81-GST

- 1) Se tapizan los pocillos de una placa Costar de 96 pocillos con 0.3 µg/pocillo de la proteína LEL de CD81 humano fusionado a GST o CD81-GST para simplificar, en 100 µl de PBS. Se incuba 16 h a temperatura ambiente.
- 2) Se bloquean los pocillos con leche en polvo desnatada al 2% en PBST. Se incuba 2 h a temperatura ambiente.
- 3) Se realizan 3 lavados con PBST.
- 4) Se añade la proteína E2 a diferentes concentraciones (0-10 µg/ml) en 100 µl de PBST, y se incuba 2 h a temperatura ambiente.
- 5) Se realizan 3 lavados con PBST.

- 6) Se añaden 100 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-E2 H53 diluido 1:300 en PBST, y se incuba 1 h a temperatura ambiente.
 - 7) Se realizan 3 lavados con PBST.
 - 8) Se añaden 100 µl/pocillo de anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con HRP (Sigma) diluido 1:1000 en PBST, y se incuba 1 h a temperatura ambiente.
 - 9) Se realizan 4 lavados con PBST.
 - 10) Se añaden 100 µl/pocillo de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; Sigma). Se incuba en la oscuridad 30 min a temperatura ambiente.
 - 11) La reacción se detiene añadiendo 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 0.5 M.
 - 12) Leer A₄₅₀.
- (Opcionalmente, se puede revelar este ELISA de la manera indicada en el apartado 4.8.1).

4.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

4.9.1. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

El análisis de aminoácidos se lleva a cabo en un analizador automático Biochrom 30. La hidrólisis de la proteína (20 µg) se realiza a vacío a 110 °C durante 24 h con 0.1 ml de HCl tridestilado azeótropo 5.9 N, conteniendo fenol al 0.1% (p/v). Finalizado el proceso, las muestras se secan en un desecador a vacío y se lavan añadiendo 2 veces un volumen de 0.1 ml de agua destilada, secando tras cada adición. A continuación, las muestras se disuelven en 100 µl de tampón de aplicación, que contiene 19.61 g de citrato sódico, 5 ml de tioglicol, 10 ml de HCl concentrado y 1 ml de ácido benzoico, en un volumen final de 1 L, a pH 2.0. La muestra se pasa a un tubo cónico de teflón, de 4 cm de longitud y 0.3 cm de diámetro, y se centrifuga 5 min a 10.000 rpm, analizándose 10-30 µl de cada muestra.

El número de nanomoles de cada aminoácido se calcula a partir del área del pico correspondiente, comparando con los valores obtenidos para una mezcla estándar de aminoácidos. Para calcular las posibles pérdidas en el

sistema de inyección se utiliza norleucina como estándar interno. Los análisis se procesan con el programa Biosys de Biochrom 30.

4.9.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN

La concentración de las diferentes disoluciones de proteína se determina a partir de los espectros de absorción en el UV-visible. Para ello, previamente se determina el coeficiente de extinción de las diferentes muestras, cuantificando la cantidad de proteína de disoluciones de proteína de absorción conocida mediante análisis de aminoácidos. Los espectros de absorción, realizados entre las longitudes de onda de 250 y 350 nm, se obtienen en un espectrofotómetro Beckman DU-640 empleando una cubeta de cuarzo de 0.1 ó de 1 cm de paso óptico, dependiendo de la concentración de proteína.

4.10. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL EXTREMO AMINO TERMINAL DE PROTEÍNAS

La secuencia amino terminal de proteínas purificadas se determinó mediante degradación automática de Edman en un secuenciador en fase gaseosa Applied Biosystems modelo 494.

Estos experimentos se llevaron a cabo en el servicio común de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

4.11. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MOLECULARES

El cálculo teórico de la masa molecular se lleva a cabo a partir de su estructura primaria empleando el programa ProtParam disponible en el servidor Expasy (<http://www.expasy.ch>).

La predicción de estructura secundaria de las diferentes proteínas recombinantes, a partir de su secuencia de aminoácidos, se llevó a cabo mediante la aplicación de métodos estadísticos descritos por Garnier y col. (1996).

4.12. ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR

Las medidas de dicroísmo circular (DC) se realizan en un dicrógrafo JASCO-715, termostatzado con un baño de agua circulante Neslab RT-111 y equipado con un arco de Xenon de 150 W. Los valores de elipticidad molar por residuo ($[\Theta]_{MRW}$), expresada en $\text{grado}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$, se calculan teniendo en cuenta el valor de la masa molecular promedio por residuo de aminoácido de cada proteína.

El espectro de DC en el UV lejano se registra a partir de una longitud de onda de 250 nm y hasta los 190 nm, empleando una cubeta de 0.1 cm de paso óptico y una concentración de proteína de 0.1-0.15 mg/ml. El tampón empleado fue Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM.

El espectro de DC en el UV próximo se registra a partir de una longitud de onda de 350 nm y hasta los 250 nm, empleando una cubeta de 0.5 cm de paso óptico y una concentración de proteína de 0.5-0.8 mg/ml. El tampón empleado fue Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM.

4.12.1. CÁLCULO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

La estructura secundaria de las diferentes proteínas se ha evaluado a partir de los espectros de dicroísmo circular mediante el método *Convex Constraint Analysis* (CCA) (Perczel *et al.*, 1991). Este método permite deducir la contribución quiral de los elementos de estructura secundaria más comunes, directamente de los espectros de DC experimentales y sin hacer uso de los datos de rayos X de proteínas conocidas. El algoritmo descompone el espectro en sus componentes puras que resultan ser muy parecidos a los que se obtienen utilizando polipéptidos modelo.

4.13. ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA

4.13.1. EMISIÓN DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA

Todos los estudios de fluorescencia se han realizado en un espectrofluorímetro SLM AMINCO 8000C (SLM Instruments), equipado con un arco de Xenon de 450 W y termostatizado mediante un baño de agua circulante. Las medidas de emisión de fluorescencia de las diferentes proteínas se llevan a cabo empleando una rendija de 4 nm, tanto en excitación como en emisión, siendo la velocidad de barrido de 60 nm/min. Los espectros se registran excitando las muestras a 275 nm o a 295 nm y midiendo la emisión de fluorescencia desde 285 nm o 310 nm, respectivamente, hasta 450 nm.

En general, a partir de estos espectros es posible conocer la contribución de las tirosinas a la emisión de fluorescencia, teniendo en cuenta que en el espectro obtenido al excitar a 295 nm sólo contribuyen los residuos de triptófano. Sin embargo, es necesario normalizar este último espectro. El factor de normalización se calcula midiendo la relación que existe entre ambos espectros a partir de una longitud de onda de 380 nm, en la que no existe contribución de las tirosinas. El espectro obtenido excitando a 295 nm se multiplica por este factor y la contribución de las tirosinas se obtiene como la diferencia entre el espectro de emisión con excitación a 275 nm y este espectro normalizado.

4.14. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER EN MODO DE REFLEXIÓN TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

La espectroscopía de infrarrojo permite el estudio simultáneo de la estructura de lípidos y proteínas en membranas biológicas intactas en ausencia de sondas externas, ya que las bandas de absorción de interés se dan en regiones espectrales diferenciadas (Goormaghtigh *et al.*, 1999). Además la elevada longitud de onda de la radiación infrarroja minimiza los problemas relacionados con la dispersión de luz.

Adicionalmente el empleo de ATR (Reflexión total atenuada) presenta dos ventajas más: se pueden obtener bicapas ordenadas en las que realizar estudios

de orientación molecular y preparar muestras por evaporación de agua, lo que evita su interferencia con la banda amida I de las proteínas.

4.14.1. ADQUISICIÓN DE ESPECTROS FTIR-ATR

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), fueron obtenidos en un espectrofotómetro Bruker IFS 66/R en la configuración de ATR (Bruker, Ettlingen, Alemania) según el protocolo descrito por Alegre-Cebollada y col. (2008). El aparato está equipado con un detector MCT enfriado con nitrógeno líquido. El elemento de reflexión interna es una placa de germanio con un ángulo de incidencia de 45° y 5 reflexiones internas.

Para realizar los espectros de proteína pura se utilizan 12 µg de proteína en solución que son depositados sobre el cristal de germanio y secados bajo una corriente de N₂ para conseguir una película fina. En el caso de los espectros realizados en presencia de lípidos, se preparan previamente las vesículas (100 µg de lípido) al pH deseado tal como se indica en el apartado 4.16.1 de esta sección. Las vesículas se preincuban 30 min a 37 °C con las proteínas (12 µg) y luego se depositan sobre el cristal de germanio tal y como se ha descrito para el caso de proteínas puras. Se realizaron experimentos control en los que no se añade proteína a las vesículas. Para eliminar la proteína no unida a las vesículas, una vez seca la película sobre el cristal de germanio, se lava con 100 µl de agua milliQ. Para cambiar el pH, la preparación secada sobre el cristal se hidrata 5 min con 100 µl de tampón a pH 5.0, tras lo cual se vuelve a secar bajo corriente de N₂.

En todos los experimentos se recoge una línea base que se realiza con el cristal limpio. Para limpiarlo se emplea Alcojet detergent powder (Cole Palmer) y agua miliQ.

Para cada espectro se registraron 256 acumulaciones a una resolución de 2 cm⁻¹. Las medidas se realizaron a 37 °C. Se utilizó un flujo de aire seco (15 L/min) para purgar el elemento óptico y los compartimentos de la muestra, con el fin de minimizar la contribución del vapor de agua en las medidas.

Los espectros obtenidos fueron registrados entre 4000 y 800 cm⁻¹ y corregidos para la absorción de agua atmosférica según el método descrito por

Goormaghtigh y col. (1999). Los espectros fueron suavizados mediante apodización por transformada de Fourier de una línea gaussiana de 4 cm^{-1} .

4.14.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE PROTEÍNAS

La estructura secundaria fue determinada teniendo en cuenta la banda amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$). Se utilizó el método de autodeconvolución de Fourier para estrechar los diferentes componentes de la banda amida I. La proporción de cada estructura particular fue computada como la suma del área de todas las bandas ajustadas a una línea Lorenciana con un máximo de frecuencia en la región donde ocurre ésa estructura dividido entre el área total de la banda amida I.

4.14.3. DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN MOLECULAR

Los espectros de proteína en presencia de lípidos fueron registrados con luz polarizada paralela y perpendicular respecto al plano de incidencia. El espectro dicroico fue computado sustrayendo el espectro polarizado perpendicular del espectro polarizado paralelo. El coeficiente de substracción fue elegido de tal manera que la banda del éster lipídico a 1740 cm^{-1} , fuera igual a cero en el espectro dicroico, para tener en cuenta el poder relativo del campo evanescente en cada polarización.

Una desviación hacia arriba en el espectro dicroico indica un dipolo orientado preferencialmente cerca de la normal del cristal de ATR. Mientras que una desviación hacia abajo indica un dipolo orientado cerca del plano del cristal de ATR. La relación dicroica (R^{ATR}) se define como la relación del área de la banda registrada para la polarización paralela (A^{\parallel}) y la polarización perpendicular (A^{\perp}):

$$R^{\text{ATR}} = A^{\parallel} / A^{\perp}$$

En ATR, la relación dicroica para una muestra isotrópica R^{iso} es diferente de uno y se computa en base a la banda del éster lipídico ($1762\text{-}1716\text{ cm}^{-1}$). El ajuste de las bandas amida I de los espectros polarizados fue llevada a

cabo para calcular las relaciones dicróicas de las diferentes estructuras secundarias. La orientación media del eje molecular con respecto a la perpendicular del cristal de ATR fue estimada como se ha descrito anteriormente (Goormaghtigh *et al.*, 1999). El dipolo C=O del lípido está desviado unos 37-38° con respecto a la normal del cristal. Se utiliza ese valor para corregir la desviación del dipolo del lípido, es decir, para considerar que el lípido está orientado perpendicular al cristal y entonces computar la orientación de la proteína con respecto a la orientación del lípido.

4.15. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA

Los estudios de ultracentrifugación analítica se realizaron en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid), en colaboración con el grupo del Dr. Germán Rivas.

Se han llevado a cabo experimentos de velocidad de sedimentación según metodologías previamente descritas (Cole y Hansen, 1999). En estos experimentos las macromoléculas se someten a un elevado campo centrífugo tal que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, por lo que existe un transporte neto de material hacia el fondo de la celda. Es un método hidrodinámico de transporte que permite fraccionar las macromoléculas en base a las diferencias en coeficiente de sedimentación (una función de la masa, la densidad y la forma macromolecular) que proporciona información acerca del grado de homogeneidad o heterogeneidad de las especies macromoleculares que sedimentan y también puede ser muy útil para detectar y cuantificar la estequiometría y la afinidad de complejos macromoleculares. De esta información se puede estimar también la forma aproximada de macromoléculas en disolución.

Se realizaron ensayos de velocidad de sedimentación a 20 °C y 48000 rpm en una ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman-Coulter), equipada con un sistema óptico de medida UV-VIS. Se emplearon celdas de doble sector de 12 mm de paso óptico. Las muestras de proteína se encontraban en tampón Mops 10 mM a pH 7.0 o 5.0 según se indique, NaCl 100 mM.

El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos se realiza mediante el ajuste directo de soluciones a la ecuación de Lamm con el programa SEDFIT (Schuck, 2000). Este ajuste no emplea valores discretos de los coeficientes de sedimentación sino distribuciones de éstos. El mejor ajuste a las soluciones de la ecuación de Lamm proporciona una distribución $c(s)$ que representa la concentración inicial de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación s .

4.16. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LÍPIDOS

4.16.1. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos utilizados fueron suministrados por Avanti Polar Lipids (Birmingham, Alabama), excepto el fosfatidilglicerol de huevo (PG) que es de Sigma.

Los fosfolípidos se disuelven en cloroformo:metanol (2:1). En todos los casos la formación de la película lipídica se realiza mediante la evaporación del disolvente orgánico bajo corriente de nitrógeno y posterior secado a vacío. A continuación se hidrata la película durante 1h en el tampón correspondiente. Esta hidratación se realiza en baño, dependiendo la temperatura de incubación de la temperatura de transición de fase del fosfolípido, con agitación vigorosa en vortex cada 10 min. A continuación, la suspensión se sonica en un sonicador de baño (Branson 1200, Branson, Connecticut, USA) y se somete a un mínimo de quince etapas de extrusión en un aparato LiposoFast™-Basic (Avestin), a través de filtros de policarbonato de 100 nm de tamaño de poro (Avestin).

4.16.2. VALORACIÓN DE FÓSFORO

La concentración de fosfolípido de las diferentes muestras se ha determinado mediante la cuantificación del fósforo, siguiendo el método descrito por Barlett (1959). El reactivo de Fiske-Subbarow se prepara disolviendo 6.25 mg de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y 5 g de bisulfito sódico en 25 ml de agua destilada. La reacción se basa en la reducción del molibdeno hexavalente

del complejo fosfomolibdato amónico, obtenido por la reacción en medio ácido entre el fosfato inorgánico y el molibdato amónico, por el reactivo de Fiske-Subbarow para formar un complejo de color azul. A la muestra a valorar se le añaden 0.3 ml de ácido sulfúrico, dejando la disolución 2 h a 190-200 °C. Se deja enfriar y se añaden 2-3 gotas de peróxido de hidrógeno. Se agita y se deja 2 h a 190-200 °C. Posteriormente, la muestra se diluye con 0.3 ml de agua destilada y se añaden 0.2 ml de molibdato amónico y 0.2 ml del reactivo de Fiske-Subbarow. Se agita y se deja a 80-90 °C hasta la aparición de color azul. Se mide la absorbancia a 830 nm y los valores obtenidos se interpolan en la recta de calibrado obtenida a partir de disoluciones de KH_2PO_4 , con cantidades comprendidas entre 50 y 1000 ng de fósforo.

4.16.3. ENSAYO DE AGREGACIÓN DE VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS

La agregación de vesículas de fosfolípidos se ha caracterizado siguiendo el incremento en densidad óptica a 360 nm inducido por la adición de las proteínas. A una preparación de vesículas, a una concentración final de 0.14 mM, se le añaden diferentes concentraciones de proteína y se registra la DO_{360} a lo largo del tiempo durante la incubación a 37 °C. Una vez que se alcanza el valor máximo, tras 15 min de incubación, se mide A_{360} con el fin de obtener las medidas puntuales. Todas las medidas se realizaron en un espectrofotómetro DU-640 (Beckman). En todos los casos se realizan controles de vesículas en ausencia de proteína. El tampón empleado fue *Medium Buffer* al valor de pH que se indique.

4.16.4. ENSAYO DE MEZCLA DE LÍPIDOS

Para seguir la adhesión y fusión de membranas inducidas por la proteína se recurre al ensayo clásico de transferencia de energía entre un par dador-aceptor, incorporados en una matriz lipídica, que se encuentren a la distancia adecuada (Struck *et al.*, 1981). En este ensayo es posible cuantificar la transferencia de energía por resonancia entre el dador N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-

diazol-4-il) fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y el aceptor N-(lisamina) rodamina B sulfonil fosfatidiletanolamina (Rh-PE), incorporados en la bicapa del liposoma.

Se preparan dos tipos diferentes de vesículas: (1) vesículas marcadas que contienen un 1% (p/p) de NBD-PE y un 0.8% (p/p) de Rh-PE, y (2) vesículas sin marcar. Todas las suspensiones de vesículas se preparan a una concentración final de lípido de 1 mg/ml en *Medium Buffer* al valor deseado de pH. A continuación, se mezclan las vesículas marcadas de la población (1) con las vesículas sin marcar de la población (2) en una proporción 1:9, manteniendo una concentración final de lípido de 1 mg/ml. Esta preparación de vesículas se diluye a continuación hasta una concentración de 0.1 mg/ml de lípido a la cual se realizan los ensayos, se añaden diferentes concentraciones de proteína y se incuban a 37 °C durante 1 h. La longitud de onda de excitación empleada es de 450 nm. La fusión de las vesículas marcadas y sin marcar se pone de manifiesto por el aumento de la emisión del NBD-PE a 530 nm y la disminución de la emisión de la Rh-PE a 590 nm. En todos los casos se mantienen rendijas de excitación y de emisión constantes a 4 nm. El polarizador de emisión se mantiene a 90° y el de excitación a 0°. La eficiencia de la transferencia de energía por resonancia (%RET) se calcula como la relación entre las intensidades de fluorescencia a 590 y 530 nm, utilizando la curva de calibrado apropiada y obtenida a partir de vesículas marcadas que contienen un 1% de NBD-PE y una concentración de Rh-PE variable entre 0 y 1%, teniendo en cuenta que:

$$\%RET = 1 - (F/F_0) \times 100$$

siendo:

- F: intensidad de fluorescencia a 530 nm de vesículas con un 1% de NBD-PE y un 0-1% de Rh-PE.
- F₀: intensidad de fluorescencia a 530 nm de vesículas marcadas que contienen un 1% de NBD-PE y un 0% (p/p) de Rh-PE.

En todos los casos, tras la adición de la cantidad correspondiente de proteína, se mide la emisión de fluorescencia a 590 nm en función del tiempo. Una vez que se estabiliza la medida, se registra el espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla.

4.16.5. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS

El ensayo de liberación del contenido acuoso de los liposomas se lleva a cabo mediante la coencapsulación del fluoróforo ácido 8-aminonaftaleno 1,3,6-trisulfónico (ANTS), a una concentración 12.5 mM, y el apagador colisional bromuro de N,N'-p-xileno-bis-piridinio (DPX), a una concentración 45 mM en *Medium buffer* al pH que se indique (Ellens et al., 1985). Las vesículas se hidratan en dichos tampones al pH deseado y, tras un proceso de sonicación, se someten a 5 ciclos de congelación en nitrógeno líquido/descongelación a 37 °C. A continuación se someten a extrusión como se ha indicado anteriormente. El material que no queda encapsulado se separa de las vesículas mediante una cromatografía de penetrabilidad en una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia) de 10 x 2 cm. Como tampón de incubación se usa *Medium Buffer* al pH que se indique. Los ensayos se realizan a una concentración de fosfolípido de 0.1 mg/ml (0.14 mM), añadiendo diferentes concentraciones de proteína e incubando a 37 °C durante 1 h. El valor de 100% de liberación se obtiene mediante adición de Triton X-100 al 0.5%, siendo el valor de 0% el obtenido al añadir tampón. Se emplea una longitud de onda de excitación de 385 nm y de emisión de 520 nm. Se sigue la cinética del proceso mediante la medida de intensidad de fluorescencia a 520 nm en función del tiempo, siempre a una temperatura de 37 °C y con agitación. El parámetro %F_{max} se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\%F_{\max} = \frac{IF_{\text{prot}} - IF_0}{IF_{\text{Triton}} - IF_0}$$

siendo:

- IF_{prot} la intensidad de fluorescencia, una vez estabilizada, tras la adición de la proteína.
- IF₀ la intensidad de fluorescencia inicial, antes de añadir la proteína.
- IF_{Triton} la intensidad de fluorescencia, una vez estabilizada, tras la adición de Triton X-100.

Todas las intensidades de fluorescencia se corrigen teniendo en cuenta la dilución que se produce cuando se añade el Triton X-100.

4.16.6. POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA

Como sondas fluorescentes se han utilizado 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 1-(4(trimetilamonio)fenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH). Los fluoróforos se disuelven en tetrahidrofurano y metanol, respectivamente, a una concentración 1 mM, añadiéndose a continuación el volumen deseado a una disolución de fosfolípido en cloroformo:metanol (2:1) para alcanzar una relación en peso final sonda:fosfolípido de 1:500 y 1:100, respectivamente. A continuación se preparan las vesículas como se ha indicado anteriormente. Las medidas de polarización de fluorescencia se llevan a cabo a una concentración de lípido de 0.1 mg/ml. Tras incubar las muestras a 37 °C durante 30 min, se procede a la determinación de la polarización de fluorescencia a diferentes temperaturas. Las lecturas se realizan tras equilibrar las muestras durante 10 min a cada temperatura. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 365 y 425 nm, respectivamente.

Las muestras se miden en el espectrofluorímetro SLM AMINCO 8000C. Para el cálculo de la polarización se debe tener en cuenta un factor de corrección, G, que viene dado por:

$$G = I_{HV} / I_{HH}$$

que corrige las anomalías de difracción introducidas por el sistema de emisión, monocromador y fototubo.

La polarización se determina como:

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VH} \cdot G}{I_{VV} + I_{VH} \cdot G}$$

El primer subíndice de las intensidades de fluorescencia (I) indica la posición vertical (V) u horizontal (H) del polarizador de excitación, correspondiendo el segundo subíndice a la posición del polarizador de emisión. Al tratarse de un espectrofluorímetro con formato en T no se precisa la determinación independiente del factor G. Las medidas de polarización se efectúan midiendo simultáneamente la emisión polarizada vertical y horizontalmente al excitar con luz polarizada vertical y horizontalmente.

4.17. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Con objeto de analizar la colocalización de la proteína recombinante E2 del HCV con diferentes receptores celulares, se recurrió a la microscopía confocal de fluorescencia. Para ello se siembran células Huh7 sobre cubreobjetos de vidrio, permitiendo su crecimiento y adhesión celular durante 16 h a 37 °C. Una vez crecidas, se retira el medio y se añade la proteína a una concentración de 25 µg/ml en medio DMEM, realizando la incubación durante 1 hora a 37 °C. Tras tres lavados con PBS, la fijación de las células se lleva a cabo por incubación con paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, tras varios lavados con PBS, las células se incuban durante 10 min con NP40 al 0.1% (p/v) en PBS con el fin de permeabilizarlas. Tras eliminar los restos de detergente con PBS, se incuban 30 min en TNB (Tris 0.1 M pH 7.0, NaCl 0.15 M y reactivo de Bloqueo (Boehringer, Roche) al 0.5% (p/v)) para evitar uniones inespecíficas. La incubación con el anticuerpo primario deseado se realiza en una cámara húmeda durante 1 h a 37 °C en PBS. El anticuerpo secundario marcado con las sondas fluorescentes FITC (Chemikon), Cy3 (Jackson IR), Alexa Flúor 594 (Invitrogen) o Alexa Flúor 488 (Invitrogen) según el caso, se añade diluido en PBS. Para marcar los núcleos se ha usado Hoechst 0.5 ng/ml (Sigma). Con el fin de mantener la fluorescencia a largo plazo, los cubres se montan utilizando un protector de fluorescencia denominado Dako (Dako). La localización subcelular se analiza utilizando un microscopio confocal Leyca SP2 equipado con tres láseres, usando una λ_{488} nm para la fluorescencia del FITC y la de Alexa flúor 488, una λ_{594} nm para el fluoróforo Alexa flúor 594, una λ_{543} nm para Cy3 y una λ_{405} nm para el Hoechst.

Las imágenes fueron tomadas en el Centro de Asistencia a la Investigación de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

4.18.1. INHIBICIÓN DE LAS VÍAS DE ENTRADA EN LA CÉLULA POR DROGAS

En el caso del estudio de las rutas de entrada de la proteína E2 del HCV en las células Huh7, se emplearon distintas drogas que inhiben diferentes vías de entrada de proteínas en la célula como son: cloruro amónico (inhibe la acidificación endosomal), β -metil-ciclodextrina (elimina el colesterol de las membranas celulares), citocalasina D (inhibe la endocitosis mediada por filamentos de actina), óxido de fenilarsina (PAO) (inhibe la endocitosis mediada por receptor) y clorpromacina (inhibe la endocitosis mediada por clatrina). Todas las drogas fueron suministradas por Sigma.

El protocolo seguido es el mismo que el descrito en el apartado anterior pero en este caso se preincubaban las células Huh7 con la droga durante un tiempo de incubación determinado, y posteriormente se añade la proteína E2.

4.18. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA (FACS)

Con el fin de conocer la capacidad de unión de E2 a la superficie de células CHO se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Se siembran 0.5×10^6 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incuban a 37 °C durante 16 h.
- 2) Se lavan las células con PBS y se levantan con 1 ml/pocillo de solución no enzimática de disociación de células (Sigma), tras incubarlas 1h a 37 °C con dicha solución. A continuación se pasan las células a tubos eppendorf.
- 3) Se lavan las células con PBSF (PBS con suero fetal bovino al 2%(v/v)). Para ello se centrifugan 5 min a 300 g y a 4 °C.
- 4) Las células se incuban en medio DMEM con la proteína recombinante a la concentración deseada 1 h a 4 °C.
- 5) Tras dos lavados con PBSF, se incuban con el anticuerpo primario anti-E2 de conejo (1:500) en PBSF durante 1 h a 4 °C.

- 6) Tras volver a lavar los pocillos dos veces con PBSF las células se incuban con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa fluor 488 (Invitrogen) a una dilución 1:1000 en PBSF durante 1 h a 4 °C.
- 7) Finalmente, tras otros tres lavados con PBSF, se conservan los tubos a 4 °C, hasta que se proceda a su medida.
- 8) Las medidas se realizan en un citómetro de flujo FACScan (Coulter Electronics).

4.19. PRODUCCIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS INFECCIOSAS DEL HCV (HCV_{pp})

Las pseudopartículas del HCV o HCV_{pp}, consisten en las glicoproteínas de la envuelta del HCV, E1 y E2 completas ensambladas en partículas retrovirales que contienen un genoma derivado de un retrovirus asociado a un gen marcador, normalmente el gen de la luciferasa. Estas HCV_{pp} permiten investigar todas las funciones mediadas por las glicoproteínas del HCV E1 y E2, además de servir como un modelo capaz de mimetizar la entrada y otras propiedades serológicas de los virus de la hepatitis C producidos en cultivo celular (HCV_{cc}).

El primer grupo que describió estas partículas fue el del Dr. François-Loïc Cosset en 2003 (Bartosch *et al.*, 2003a). El protocolo seguido para la obtención de estas HCV_{pp} ha sido el siguiente:

- 1) Se siembran 1.0×10^6 células HEK 293T en una placa de 10 cm de diámetro a partir de un flask confluyente al 80% y se incuban 16 h a 37 °C.
- 2) Cuando las células alcanzan el 40% de confluencia, se procede a transfectarlas mediante precipitación por fosfato cálcico, según el siguiente protocolo:

Por placa de 10 cm:

- a) En un tubo estéril se añaden los siguientes reactivos en el orden indicado:

1. pMLV-Luc	8µg
2.pMLV-Gag-Pol	8µg
3.pcDNA3.1-E1E2	3µg

4. CaCl_2 2.5 M 100 μl

5. H_2O hasta 500 μl

- b) En otro tubo estéril, se añaden 500 μl de tampón HEBS 2x (NaCl 0.283 M, Hepes 0.023 M pH 7.05 y Na_2HPO_4 1.5 mM).
 - c) Se burbujea el tampón HEBS 2x a la vez que se añaden la mezcla de DNA con CaCl_2 gota a gota. Se observa la formación de un precipitado blanco. Se incuba 20 min a temperatura ambiente.
 - d) El precipitado se distribuye sobre las células y se incuba a 37 °C hasta el día siguiente.
- 3) Se reemplaza el medio de las células por 6 ml de medio fresco con Hepes 10 mM pH 7.0, y se incuba 24 h a 37 °C.
 - 4) Pasado este tiempo, se recoge el sobrenadante de las células conteniendo las partículas, y se filtran a través de un filtro de 0.45 μm . En este momento las partículas se pueden congelar a -80 °C, lo que supone una pérdida del 50% en su infectividad, o pueden ser purificadas tal y como se detalla en el apartado siguiente.
 - 5) Las células HEK 293T transfectadas pueden ser lisadas con 1 ml de tampón de lisis (Tris 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Igepal CA-630 1% y iodoacetamida 20 mM). Se agitan 10 min a temperatura ambiente, se recoge el lisado y se centrifuga 10 min a alta velocidad para clarificarlo.

4.19.1. PURIFICACIÓN DE HCVpp EN COJÍN DE SACAROSA

- 1) Se centrifuga el sobrenadante de las células HEK 293T transfectadas 10 min a 2000 rpm para clarificarlas.
- 2) Se filtran a través de un filtro de 45 μm .
- 3) El sobrenadante de las células se añade cuidadosamente sobre un 1.5 ml de sacarosa al 20% (p/v) en PBS.
- 4) Se centrifuga 127 min a 30000 rpm y a 4 °C, en un rotor SW40.
- 5) El sobrenadante se descarta y se deja el tubo boca abajo unos minutos para permitir que se seque el precipitado.

- 6) Se resuspende el precipitado conteniendo las HCVpps purificadas en PBS, DMEM o tampón de aplicación de electroforesis, según el uso que se les vaya a dar a estas partículas.

4.20. INFECCIÓN DE CÉLULAS Huh7 CON HCV_{pp}

Una vez obtenidas las HCVpp, se procede a la infección de las Huh7. El protocolo seguido se describe a continuación:

- 1) Se siembran células Huh7 en una placa de 96 (p96) o 24 (p24) pocillos, 4×10^3 células/pocillo en una placa de 96, y 2.5×10^4 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Se incuban 16 h a 37 °C.
- 2) Tras retirar el medio de las células, se añade un volumen adecuado de HCVpp (30-50 µl/pocillo en p96 y 150 µl/pocillo en p24). Se incuban 3-4 h a 37 °C, agitando cada 30 min.
- 3) Se retira el inóculo y se añade medio fresco. Las células infectadas se incuban 3 días a 37 °C.
- 4) Pasado este tiempo, se analiza la actividad del gen de la luciferasa. Para ello se utiliza el kit de ensayo de la luciferasa Bright-Glo de Promega. Se retira el medio y se lisan las células en 100 µl de tampón de lisis Glo. Se añaden 100 µl de sustrato Bright-Glo y se mide la actividad luciferasa en un luminómetro LB9507 (Thermo Fisher).

4.20.1. NEUTRALIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DE HCV_{pp}

Este ensayo se realiza tanto con la proteína soluble E2₆₆₁ o con anticuerpos anti-E2. Para ello, antes de infectar las células con las pseudopartículas, se incuban las células Huh7 con la proteína E2 o bien se incuban las HCVpp con los anticuerpos anti-E2, durante 1h a 37 °C en el caso de la proteína soluble o 1h a 4 °C en el caso de los anticuerpos. A continuación, se añaden las partículas sobre las células y se sigue el protocolo descrito en el apartado anterior.

The page features a teal-colored header bar at the top and a matching footer bar at the bottom. The central content area is white and framed by thin teal lines on the left and right sides.

RESULTADOS

5.1. MUTANTES DE DELECCIÓN DE LOS PÉPTIDOS DE FUSIÓN DE E2₆₆₁

La mayoría de los trabajos científicos presentados hasta el momento señalan a E2 como la proteína responsable de la fusión entre las membranas virales y celulares, fusión que se produce a pH ácido. Atendiendo a distintos estudios, se han diseñado mutantes de delección que carecen de regiones potencialmente fusogénicas de E2 con el fin de determinar su papel en el proceso de entrada del virus en la célula. Estos mutantes han sido clasificados en tres bloques y se describen a continuación.

5.1.1. MUTANTES DE FUSIÓN SEGÚN EL PERFIL DE HIDROFOBICIDAD

Mediante la observación de los perfiles de hidrofobicidad interfacial y de hidropatía de E2 (Figura 16), se han observado 3 regiones susceptibles de insertarse en la membrana, y por lo tanto, de ser candidatas a péptidos de fusión. La escala de la izquierda permite conocer secuencias de aminoácidos con capacidad de interaccionar con interfases de membrana (Wimley y White, 1996). La escala de la derecha permite localizar regiones hidrofóbicas (Kyte y Doolittle, 1982).

Atendiendo al perfil de hidrofobicidad interfacial, se han diseñado tres mutantes sencillos en los que se han delecionado una a una las regiones fusogénicas indicadas en la Figura 16, y un mutante triple, en el que se han eliminado las tres regiones a la vez, con el fin de conocer cómo puede afectar la ausencia de dichas regiones de E2 en el proceso de fusión. Además, estos tres posibles péptidos fusogénicos han sido sintetizados previamente y se ha comprobado que tienen capacidad para desestabilizar membranas (Pacheco *et al.*, 2006).

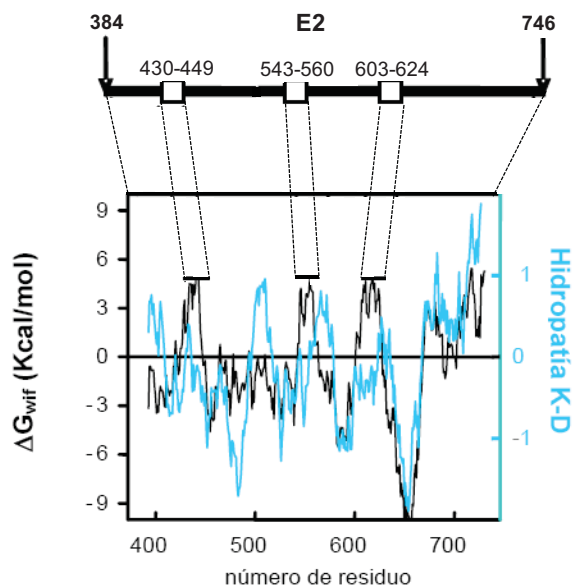


Figura 16. Perfiles de hidrofobicidad interfacial y de hidropatía de la proteína E2 del HCV. La hidrofobicidad interfacial (negro) se determinó utilizando la escala de Wimley y White (1996) y la hidropatía (azul) según la escala de Kyte y Doolittle (1982).

5.1.1.1. Clonación

La clonación de los ADN codificantes de los distintos mutantes de E2 se realizó en el vector pAcGP67-A con el fin de expresarlos posteriormente en el sistema de baculovirus. Para facilitar su purificación se ha añadido una extensión de seis histidinas en el extremo amino terminal de las proteínas. En todos los casos, tanto los ADN codificantes de los mutantes obtenidos como el plásmido pAcGP67-A-E2₆₆₁ (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009) son digeridos con las endonucleasas *Bam*HI/*Eco*RI y ligados posteriormente para obtener los plásmidos recombinantes deseados.

Para simplificar la nomenclatura de estos mutantes se va a nombrar a cada uno por el primer aminoácido de la delección de ahora en adelante.

A) Clonación de los mutantes de delección sencillos de los péptidos de fusión de E2₆₆₁: E2_{Δ430}, E2_{Δ543} y E2_{Δ603}.

El método empleado es el descrito por Pogulis y col. (1996). En primer lugar, se amplifican por separado las regiones a ambos lados de la delección mediante PCR, usando como molde el plásmido pAcGP67-A-E2₆₆₁, que incluye la secuencia del ectodominio de E2 completo (residuos 384 a 661, o E2₆₆₁). Los cebadores internos de cada mutante tienen una región complementaria de 18 nucleótidos, que corresponden a los 9 nucleótidos finales de la región situada antes de la delección y a los primeros 9 nucleótidos de la situada después de la delección. Después de una segunda PCR de elongación sin cebadores, se realiza una tercera PCR para amplificar el ADN codificante de los mutantes que se liga posteriormente en el plásmido pAcGP67-A (Figura 17).

Los oligonucleótidos empleados para cada delección se indican a continuación:

Para E2_{Δ430}:

E2DEL430 (+): 5'-CTG AAC TGC TCA GGT TGT CCC GAG A-3'
L₄₂₇ N₄₂₈ C₄₂₉ S₄₅₀ G₄₅₁ C₄₅₂ P₄₅₃ E₄₅₄

E2DEL430 (-): 5'-ACA ACC TGA GCA GTT CAG AGC TGT G-3'
C₄₅₂ G₄₅₁ S₄₅₀ C₄₂₉ N₄₂₈ L₄₂₇ A₄₂₆ T₄₂₅

Para E2_{Δ543}:

E2DEL543 (+): 5'-AAC AAC ACC ACC AAA GTG TGC GGA G-3'
N₅₄₀ N₅₄₁ T₅₄₂ T₅₆₁ K₅₆₂ V₅₆₃ C₅₆₄ G₅₆₅

E2DEL543 (-): 5'-CAC TTT GGT GGT GTT GTT AAG GAC G-3'
V₅₆₃ K₅₆₂ T₅₆₁ T₅₄₂ N₅₄₁ N₅₄₀ L₅₃₉ V₅₃₈

Para E2_{Δ603}:

E2DEL603 (+): 5'-GGT CCC TGG ACC ATA TTC AAA GTC A-3'
G₆₀₀ P₆₀₁ W₆₀₂ T₆₂₅ I₆₂₆ F₆₂₇ K₆₂₈ V₆₂₉

E2DEL603 (-): 5'-GAA TAT GGT CCA GGG ACC GGA GCC A-3'
F₆₂₇ I₆₂₆ T₆₂₅ W₆₀₂ P₆₀₁ G₆₀₀ S₅₉₉ G₅₉₈

En la línea superior se muestra la secuencia de bases de cada oligonucleótido, y en la línea inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente.

Para los extremos 5' y 3' de cada construcción se han empleado los oligonucleótidos del plásmido pAcGP67-A que flanquean el gen a clonar:

Gp67 (+): 5'-CAA GAT GGT AAG CGC TAT TG-3' (bases 4185-4204 de pAcGP67-A)

Gp67 (-): 5'-GGG TTT AAC ATT ACG GAT TTC-3' (bases 4365-4345 de pAcGP67-A)

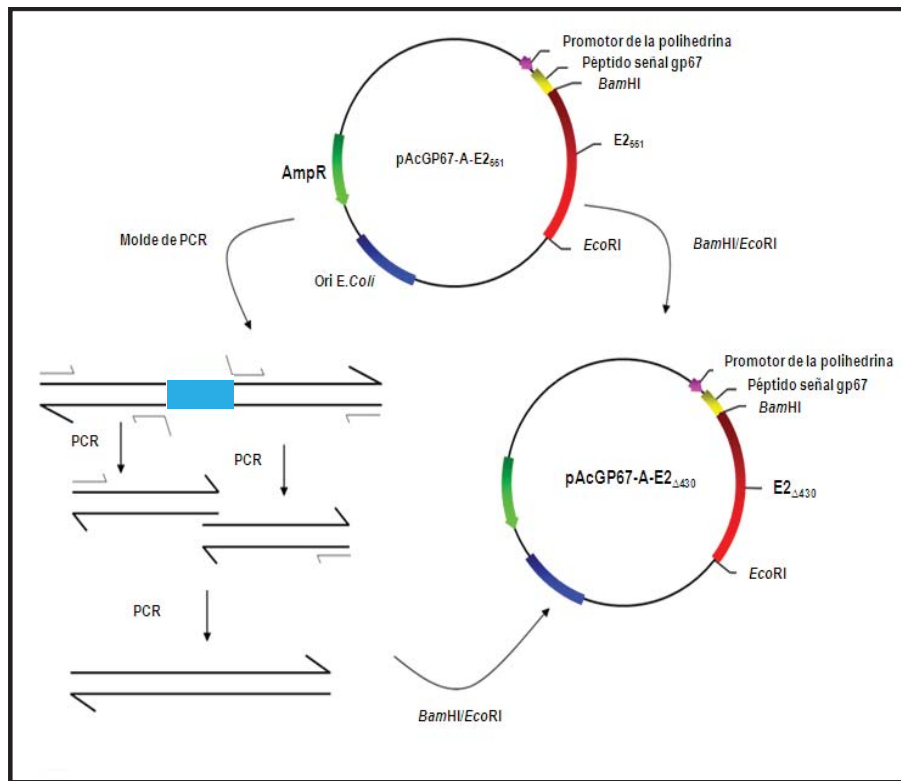


Figura 17. Esquema de clonación de los mutantes de delección sencillos de E2₆₆₁ en pAcGP67-A. Los ADNs codificantes de los mutantes de delección fueron obtenidos a partir del ADN codificante de E2₆₆₁ mediante reacciones de PCR consecutivas como se indica en la figura. A modo de ejemplo, se muestra la clonación de E2₄₃₀ en pAcGP67-A.

B) Clonación de E2TM (Triple Mutante)

Este mutante ha sido obtenido a partir de los mutantes sencillos de delección de los péptidos de fusión mediante digestiones con distintas enzimas de restricción que tienen un único sitio de corte en las regiones del ADN que están entre las distintas delecciones. Así, se realizó la digestión de pAcGP67-A-E2_{Δ430} con las enzimas *Bam*HI/*Apa*I para obtener el fragmento de E2 desde la región amino terminal hasta el residuo 471, tras la primera delección. El plásmido pAcGP67A-E2_{Δ543} fue digerido con *Apa*I/*Sac*I que permitió la obtención del fragmento que comprende los residuos 471-567 con la segunda delección. Por último, el plásmido pAcGP67A-E2_{Δ603} fue digerido con *Sac*I/*Eco*RI, obteniéndose la región de aminoácidos comprendida entre 567-661, y conteniendo la tercera delección. Tras la ligación de los 3 fragmentos digeridos que contienen las delecciones, se amplifica el ADN por PCR empleando los oligonucleótidos Gp67 (+) y Gp67 (-). La clonación en el vector pAcGP67-A se realiza tal y como se ha descrito para los mutantes sencillos en el apartado anterior.

5.1.1.2. Expresión y purificación

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes se procedió a realizar la cotransfección de células de insecto Sf9 con el genoma del baculovirus linealizado y los plásmidos recombinantes obtenidos anteriormente, tal como se indica en el apartado 4.3.2.1 de Materiales y Métodos. Tras la purificación y la amplificación de los baculovirus recombinantes en células Tni, se comprobó la expresión de las proteínas mutantes tanto en el sedimento celular como en el sobrenadante tras 5 días de infección. Para ello se realizó una inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-6His, detectándose, para cada mutante, que la proteína es secretada al medio extracelular en gran cantidad (Figura 18A).

Con el fin de optimizar la producción de estas proteínas, se monitorizó la expresión a diferentes tiempos de infección (1, 2, 3, 4, y 5 días), fijándose la expresión óptima de la proteína recombinante en 5 días (Figura 18B).

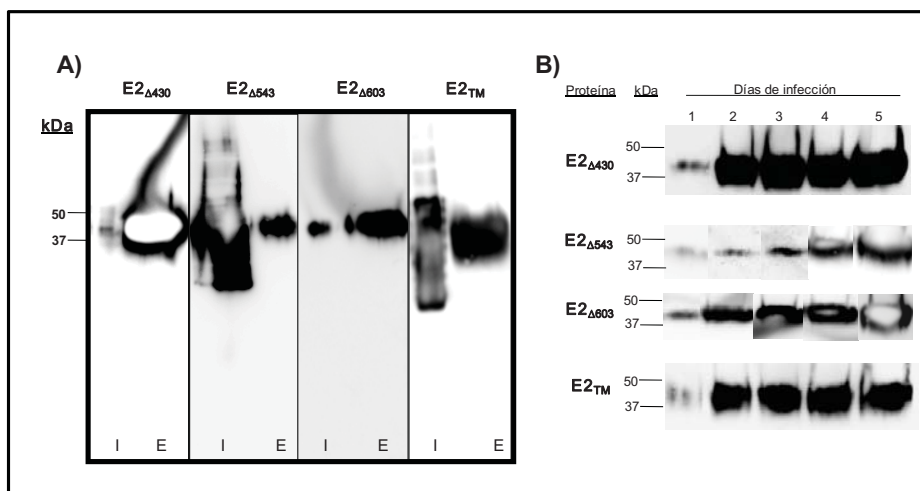


Figura 18. Expresión de los mutantes de fusión de E2₆₆₁ en células de insecto (Tni). A) Expresión intracelular (I) y expresión en el sobrenadante o extracelular (E), tras 5 días de infección. B) Expresión en función de los días de infección. La detección se ha realizado con un anticuerpo monoclonal anti-6His.

Todas las proteínas se han purificado a partir del medio extracelular de las células Tni mediante una cromatografía de afinidad empleando una columna de Ni-NTA-agarosa, tal y como se indica en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos. Durante el proceso de purificación la mayor parte de la proteína es retenida en la columna, y la elución de ésta con imidazol 200 mM permite obtener entre 5-20 mg de proteína por litro de cultivo. Tras su elución, las proteínas fueron dializadas frente al tampón adecuado.

De esta forma se han obtenido todos los mutantes con un alto grado de pureza, determinado mediante PAGE-SDS (Figura 19). Las masas moleculares experimentales de las proteínas resultaron ser unos 15 kDa mayores a las teóricas calculadas a partir de las secuencia de aminoácidos. Estas diferencias son debidas a que las proteínas secretadas por las células de insecto se encuentran glicosiladas, hecho que es de esperar ya que E2 presenta numerosas secuencias de glicosilación.

Los análisis de aminoácidos de las proteínas purificadas coinciden con las composiciones teóricas deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de sus ADN codificantes. Para el cálculo de la concentración de todas estas proteínas se han usado los coeficientes de extinción experimentales calculados a

partir de estos análisis de aminoácidos, que en todos los casos son muy similares a los teóricos (Tabla 2).

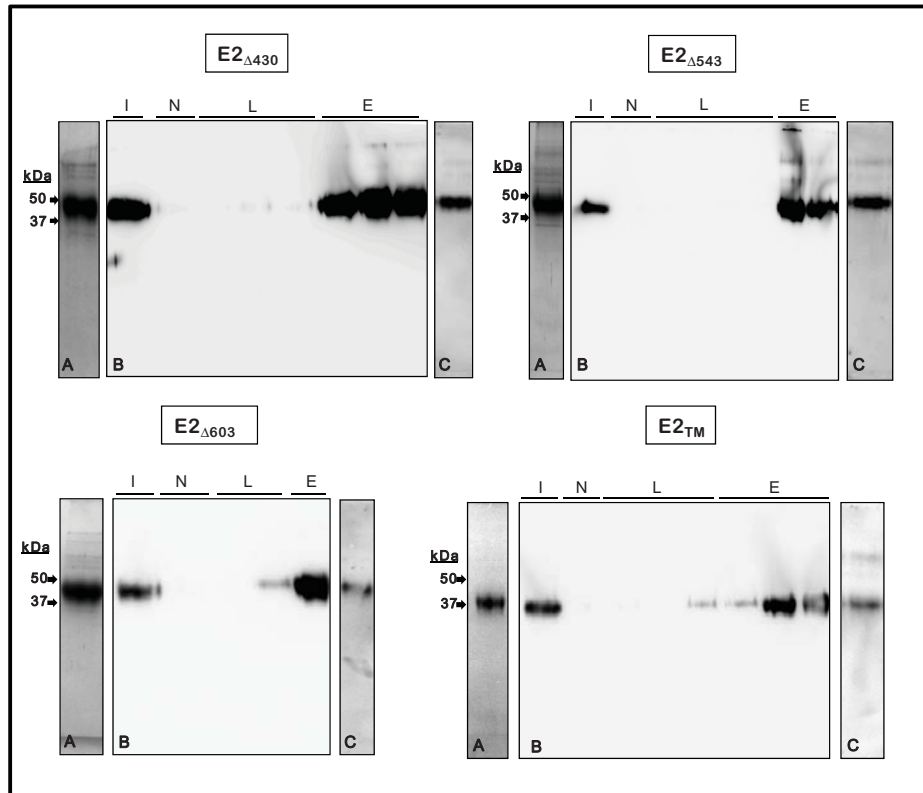


Figura 19. Purificación de los mutantes de fusión de E2₆₆₁. Panel A) Tinción con azul de Coomassie de las muestras purificadas. Panel B) Inmunodetección con anti-6His de las muestras purificadas. I: medio inicial; N: no retenido; L: lavados con tampón con imidazol 10 y 20 mM; E: elución con tampón con imidazol 200 mM. Panel C) Inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-E2 de cabra de las muestras purificadas y dializadas.

Proteína	E ^{0.1%} teórico	E ^{0.1%} experimental
E2 ₆₆₁	2.3	2.3
E2 _{Δ430}	2.2	2.2
E2 _{Δ543}	2.1	2.0
E2 _{Δ603}	2.15	2.2
E2 _{TM}	1.75	1.7

Tabla 2. Coeficientes de extinción (E^{0.1%}) teóricos y experimentales de los mutantes de fusión de E2₆₆₁. Los coeficientes teóricos han sido obtenidos mediante la secuencia de aminoácidos (Protparam) y los experimentales han sido calculados a partir de los datos obtenidos en los análisis de aminoácidos.

5.1.1.3. Caracterización estructural

5.1.1.3.1. Caracterización espectroscópica

Con el objetivo de observar si existen cambios estructurales importantes en los mutantes obtenidos con respecto a la glicoproteína E2₆₆₁, se llevó a cabo una caracterización espectroscópica de las proteínas mutantes mediante dicroísmo circular, en el ultravioleta próximo y en el ultravioleta lejano, así como mediante espectroscopía de fluorescencia.

A) Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano presentan un mínimo en torno a 204-209 nm, con una elipticidad molar por residuo de -5900 a -7400 grado·cm²·dmol⁻¹, indicativo de la existencia de un porcentaje relativamente alto de estructura aperiódica (Figura 20A). A partir de estos datos experimentales y utilizando el método Convex Constraint Analysis (CCA) (Perczel *et al.*, 1991) se determinaron los porcentajes de estructura secundaria para cada proteína, que se recogen en la Tabla 3. Se observa que todos los mutantes presentan un alto porcentaje de estructura β , siendo el contenido en hélice α muy bajo, como ocurre con la proteína E2₆₆₁. En todos los mutantes, al igual que en la proteína E2₆₆₁, se observa un aumento del contenido en estructura β con respecto a los valores obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos mediante el método GOR IV de Garnier (Garnier *et al.*, 1996), que predice la tendencia de los diferentes aminoácidos a adoptar una estructura secundaria determinada. En cualquier caso, con ambos métodos se obtiene que todos los mutantes poseen un elevado porcentaje de estructura no ordenada siendo la estructura ordenada mayoritaria la de tipo extendido. Por lo tanto, de acuerdo con los datos obtenidos, se puede afirmar que no se han producido variaciones importantes en la estructura secundaria de E2₆₆₁ al delecionar las regiones fusogénicas indicadas.

Por otro lado, las bandas dicroicas negativas observadas en los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo, que aparecen en torno a 270 y

300 nm, ponen de manifiesto el carácter asimétrico del entorno en el que se encuentran los cromóforos de las proteínas (Figura 20B). Por tanto, todos los mutantes obtenidos, al igual que E2₆₆₁, presentan una estructura tridimensional capaz de suministrar un entorno asimétrico a los cromóforos y se pueden considerar, por lo tanto, proteínas con una estructura no desnaturalizada.

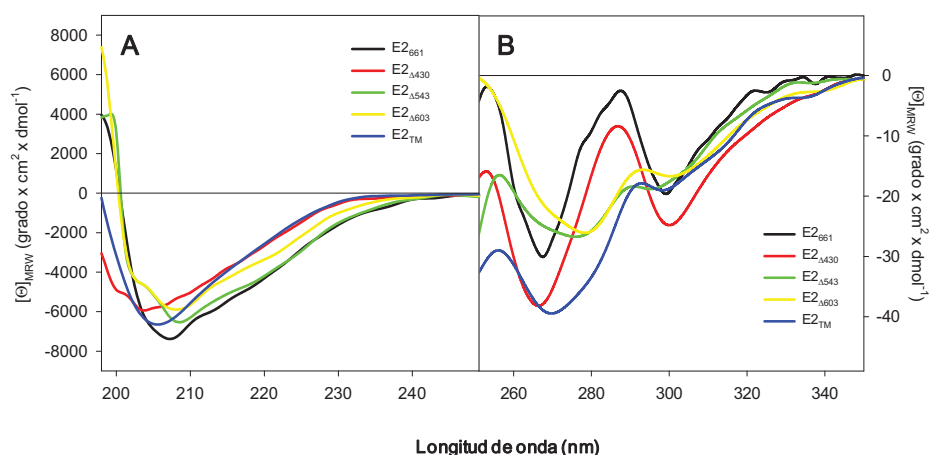


Figura 20. Espectros de dicroísmo circular de E2₆₆₁ y de sus mutantes de fusión en el ultravioleta lejano (A) y en el ultravioleta próximo (B). Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM a temperatura ambiente. La concentración de proteína empleada es 0.15 mg/ml y el paso óptico 0.1 cm (A) y 0.5 mg/ml y paso óptico de 0.5 cm (B). Ambos espectros son el resultado de 5 acumulaciones y han sido corregidos frente a las contribuciones del tampón.

% Estructura secundaria	E2 ₆₆₁		E2 _{Δ430}		E2 _{Δ543}		E2 _{Δ603}		E2 _{TM}	
	E	T	E	T	E	T	E	T	E	T
Hélice α	12	2	6	2	10	2	7	2	10	2
Estructura β	47	34	52	35	51	32	53	34	53	33
No ordenada	41	64	42	63	39	66	40	64	37	65

Tabla 3. Porcentajes de estructura secundaria de E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión. Los porcentajes de estructura secundaria experimentales (E) fueron obtenidos aplicando el método CCA (Perczel *et al.*, 1991) a los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, mientras que los teóricos (T) se obtuvieron mediante el método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) para tres componentes.

Las señales obtenidas en la región de 250-270 nm son atribuibles a los residuos de Phe, las señales obtenidas entre 270 y 290 nm son debidas a los residuos de Tyr, y las señales obtenidas entre 280 y 300 nm son debidas a los Trp. En el caso de E2 $_{\Delta 430}$ no se observa ningún cambio en el espectro con respecto a E2 $_{661}$, por lo tanto la delección de la región 430-449 no provoca cambios en la estructura terciaria de la proteína. En el caso de E2 $_{\Delta 543}$, E2 $_{\Delta 603}$ y E2 $_{TM}$, el pico a 290 nm, y el mínimo a 300 nm observados en el espectro de E2 $_{661}$ prácticamente desaparecen. Esto puede ser debido a la eliminación de varios residuos de Trp y Tyr en las regiones delecionadas.

B) Espectros de emisión de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia permite estudiar el microentorno de los fluoróforos de una proteína. Los espectros de emisión de fluorescencia a pH 7.0 de las proteínas mutantes presentan un máximo en torno a los 334-337 nm, cuando se excitan las moléculas a las longitudes de onda de 275 nm y 295 nm (Figura 21). El triptófano libre en disolución tiene un máximo de emisión en torno a 348 nm, mientras que cuando este residuo está en un entorno muy hidrofóbico el máximo de emisión de fluorescencia se desplaza a longitudes de onda entre los 310-320 nm (Lackowicz, 1983). Por lo tanto, los espectros de emisión de fluorescencia indican que los Trp de las proteínas se encuentran en un microentorno relativamente poco hidrofóbico.

Además, todos los espectros muestran una contribución muy baja de los residuos de tirosina (Figura 21). Por tanto, son los residuos de Trp de estas proteínas los que determinan la emisión de fluorescencia, estando la de los residuos de Tyr apagada por residuos próximos o bien por transferencia de energía a los residuos de Trp. En la Tabla 4 se comparan los datos obtenidos para cada proteína estudiada con los obtenidos para E2 $_{661}$. Se observa un pequeño desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo (3 nm), en el caso de los mutantes E2 $_{\Delta 430}$ y E2 $_{TM}$, lo que indicaría que los residuos de Trp estarían algo más expuestos al disolvente. En general, no se observan grandes variaciones en el microentorno de los fluoróforos de la proteína E2 al deleccionar los posibles péptidos fusogénicos.

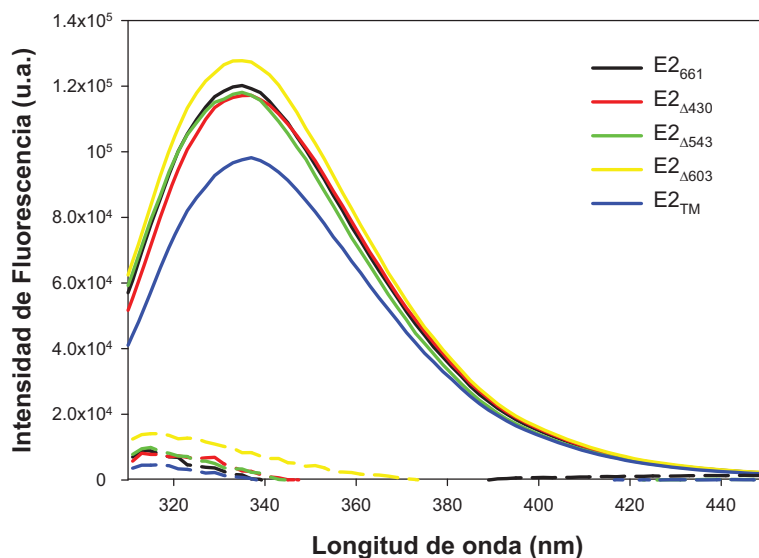


Figura 21. Espectros de emisión de fluorescencia de E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión según el perfil de hidrofobicidad. Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM a una concentración de 0.05 mg/ml. Se muestran los espectros obtenidos al excitar con una longitud de onda de 275 nm (—), y la contribución de las tirosinas (---) calculada según se describe en el apartado 4.13.1 de Materiales y Métodos.

PROTEÍNA	Máximo de emisión (nm)
E2 ₆₆₁	334
E2 _{Δ430}	337
E2 _{Δ543}	335
E2 _{Δ603}	334
E2 _{TM}	337

Tabla 4. Comparación del máximo de emisión entre E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión.

5.1.1.3.2. Caracterización del estado de oligomerización

Con el fin de determinar la posible existencia de variaciones en el estado de oligomerización de las proteínas mutantes con respecto a E2₆₆₁ se aplicaron las proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, en presencia o ausencia del agente reductor β-mercaptoetanol (Figura 22). De esta

forma se observó que todas las proteínas migran como una única banda en condiciones desnaturalizantes y reductoras, mientras que cuando se preservan los puentes disulfuro, las proteínas migran en al menos cuatro bandas que corresponden a las formas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica, existiendo un porcentaje de moléculas que forman estructuras oligoméricas más grandes y que no entran en el entramado del gel. Este resultado indica que tanto E2₆₆₁ como los mutantes de fusión se encuentran, en parte, formando oligómeros en los que los monómeros se asocian, al menos, mediante la formación de puentes disulfuro.

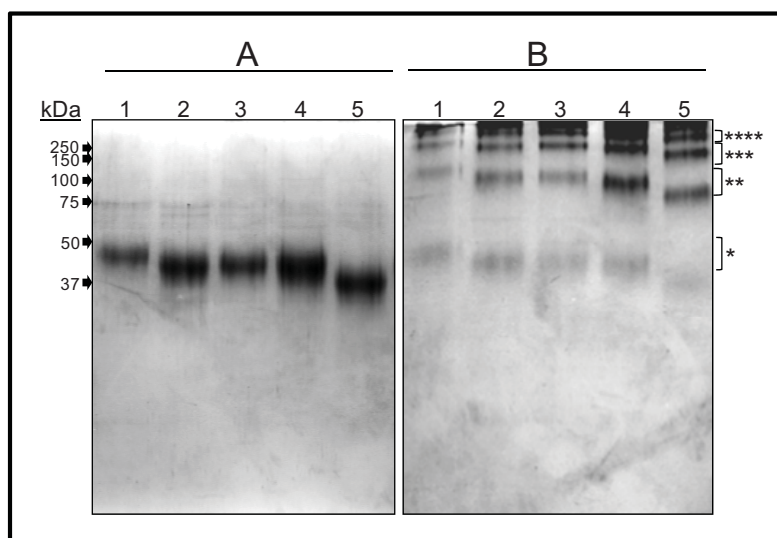


Figura 22. PAGE-SDS al 15% de la proteína E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión (A) en presencia de SDS 1% (p/v) y β -mercaptoetanol 5% (v/v) y (B) en condiciones no reductoras. (1) E2₆₆₁, (2) E2 _{Δ 430}, (3) E2 _{Δ 543}, (4) E2 _{Δ 603} y (5) E2_{TM}. (*) Monómero; () Dímero; (***) Trímero; (****) Tetramero.**

5.1.1.3.3. Caracterización antigénica

Utilizando una batería de sueros tanto de pacientes infectados por el HCV como de pacientes negativos frente al HCV, se estudió la capacidad antigénica de los mutantes de fusión de E2₆₆₁ con el fin de compararla con la de dicha proteína mediante enzimoimmunoensayo. Como se muestra en la Figura 23, las

proteínas mutantes purificadas y en condiciones nativas muestran variaciones en su capacidad de unión a los anticuerpos presentes en los sueros positivos con respecto al ectodominio completo. Se observa una mayor antigenicidad del mutante E2 Δ 430 para la mayoría de los sueros ensayados, mientras que el resto de los mutantes presenta una antigenicidad inferior, llegando a ser prácticamente nula en el caso de E2 Δ 543 y de E2 $_{TM}$ y muy baja para E2 Δ 603, lo que indica variaciones en la exposición de los epítomos o la eliminación de los mismos en los mutantes con respecto a E2 $_{661}$.

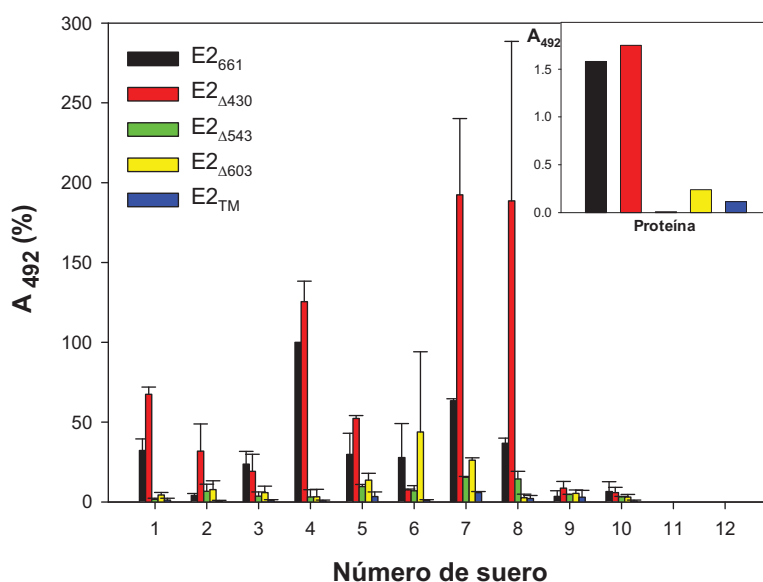


Figura 23. ELISA con los sueros de pacientes infectados por el HCV (sueros 1 a 8) y de pacientes sanos (sueros 9 y 10) para la detección de E2 $_{661}$ y sus mutantes de fusión. El ensayo se realizó tapizando las placas con 0.1 μ g de proteína/pocillo y con los sueros diluidos 1:100-1:500. Se ensayaron un total de 8 sueros negativos y todos proporcionaron la misma absorbancia que los sueros 9 y 10. El valor del 100% de A $_{492}$ ha sido asignado a la absorbancia proporcionada por E2 $_{661}$ con el suero n° 4, por ser el valor máximo obtenido con esta proteína. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes. Recuadro interior: ELISA con H53 para la detección de E2 $_{661}$ y sus mutantes de fusión. Este ensayo se ha realizado tal y como se indica en el apartado 4.8.2 de Materiales y Métodos.

Para comprobar si la pérdida de antigenicidad observada en el ensayo anterior es debida a una pérdida de la conformación original de E2 $_{661}$ en los

mutantes se ha realizado un ensayo de inmunoensayo empleando el anticuerpo monoclonal conformacional H53 que reconoce a la proteína E2 del HCV cuando está correctamente plegada (Cocquerel *et al.*, 1998).

Como se observa en el recuadro interior de la Figura 23, el anticuerpo H53 no es capaz de reconocer a E2 Δ 543 y débilmente a E2 Δ 603 y a E2_{TM}. Puede que el epítipo reconocido por este anticuerpo esté comprendido, al menos en parte, en las regiones delecionadas en estos mutantes, o bien que al eliminar las regiones de residuos 543-560 y 603-624 se pierda parcialmente la conformación original de E2₆₆₁.

5.1.1.4. Estudio de la estructura de las proteínas en presencia de lípidos: Espectros FTIR-ATR

Con el objetivo de estudiar la estructura de las proteínas en presencia de vesículas lipídicas se ha recurrido a la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en el modo ATR. En primer lugar, se registraron los espectros de las proteínas en ausencia de lípidos tanto a pH 7.0 como a pH 5.0. A continuación, se registraron los espectros de las proteínas en presencia de vesículas de DMPG a ambos valores de pH. Los espectros obtenidos, así como su diferencia se muestran en la Figura 24. A pH 7.0, con E2₆₆₁ y todas las proteínas mutantes, se obtiene el mismo resultado al restar el espectro obtenido en presencia y en ausencia de vesículas: una banda ancha y negativa que ocupa casi toda la región de la banda amida I (1700-1600 cm⁻¹). En cambio a pH 5.0, en el caso de las proteínas E2₆₆₁, E2 Δ 430 y E2 Δ 543, se obtiene un sutil pico más estrecho y centrado en torno a los 1655 cm⁻¹, lo que es indicativo de una estructura en hélice α (Goormaghtigh *et al.*, 1990). El porcentaje del área del pico obtenido en el espectro de diferencia con respecto al área de la banda amida I obtenida en el espectro de proteína pura representa alrededor de un 10%. En el caso de los otros dos mutantes de fusión, E2 Δ 603 y E2_{TM}, no se obtiene este pico en los espectros de diferencia. En la Figura 24 se muestran únicamente los espectros de las proteínas E2₆₆₁, por ser prácticamente idénticos a los de las proteínas E2 Δ 430 y E2 Δ 543, y los de E2 Δ 603, por ser prácticamente idénticos a los de E2_{TM}. Estos datos indican que a pH 5.0 las vesículas de DMPG inducen la

formación de una estructura en hélice α en E2₆₆₁ que representa el 10% de la estructura de la proteína, o lo que es lo mismo, un segmento de unos 30 aminoácidos adopta una estructura en hélice α en presencia de las vesículas. Y además al eliminar la región de aminoácidos 603 a 624, se anula el efecto producido por la interacción con las vesículas de DMPG, lo que puede sugerir que dicho péptido es el que adopta la estructura helicoidal al interactuar con las vesículas.

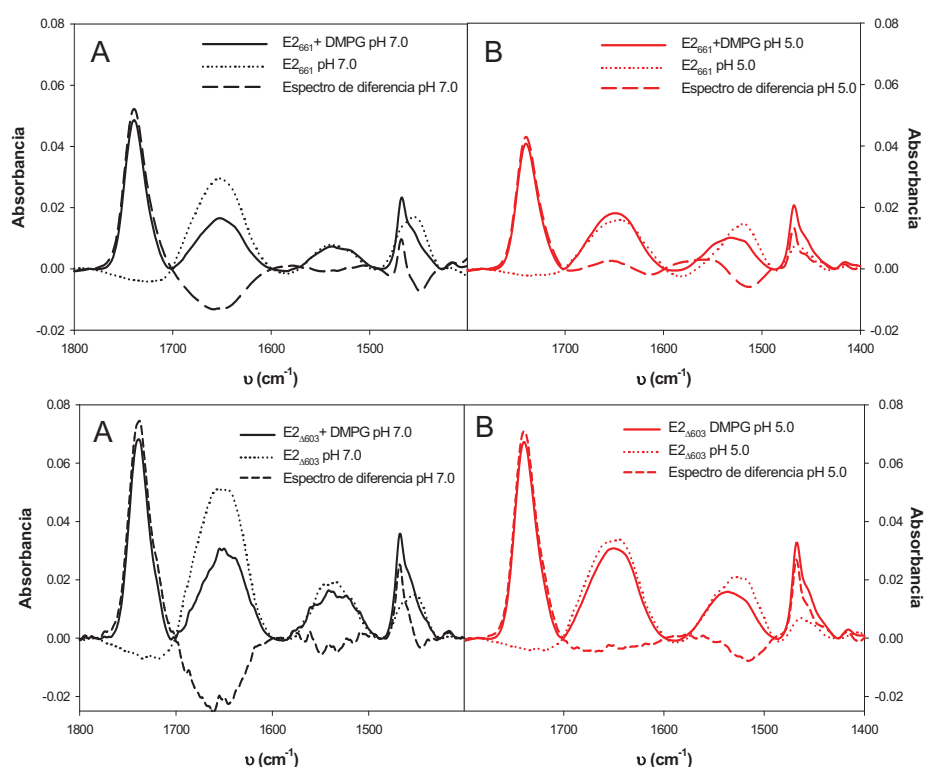


Figura 24. Espectros FTIR-ATR de E2₆₆₁ y E2_{Δ603} en presencia y en ausencia de vesículas de DMPG, y su diferencia a pH 7.0 (A) y pH 5.0 (B). En los espectros de proteína pura el tampón empleado ha sido Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM y fosfato sódico 66 mM, pH 5.0. Se han realizado los espectros con 12 μ g de proteína. En los espectros en presencia de vesículas de DMPG el tampón empleado fue Tris 5 mM, Mes 5 mM, Acetato sódico 5 mM, NaCl 0.1 M a pH 7.0 ó 5.0. Se han realizado los espectros con 100 μ g de lípido y 12 μ g de proteína, previamente incubados 30 min a 37 °C. En ambos casos la proteína no unida se ha eliminado mediante un lavado con agua. Los espectros de diferencia (— —) se han obtenido tras restar los espectros en presencia y ausencia de lípidos a ambos valores de pH.

Para corroborar los resultados anteriores se han calculado los porcentajes de estructura secundaria de las proteínas en presencia y en ausencia de vesículas de DMPG mediante el método de autodeconvolución de Fourier a partir de la banda amida I (Tabla 5). Los datos obtenidos en ausencia de lípidos muestran que no existen variaciones grandes en cuanto a los porcentajes de estructura secundaria obtenidos para ambos valores de pH. Estos datos están de acuerdo con los datos obtenidos en dicroísmo circular en el ultravioleta lejano para E2₆₆₁, en los que no se observan variaciones en la estructura secundaria de la proteína entre valores de pH comprendidos entre 3.0 y 11.0 (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007). Tampoco se aprecian variaciones importantes en términos de estructura secundaria en los mutantes de fusión en comparación con E2₆₆₁, al igual que se obtuvo en los espectros de dicroísmo circular (Tablas 3 y 5). Al comparar los datos obtenidos en ausencia y en presencia de lípidos, se observa un aumento en el contenido en hélice α en todos los mutantes, para ambos valores de pH, no observándose las variaciones obtenidas en los espectros de diferencia anteriores, lo que puede reflejar las limitaciones de esta técnica para asignar los porcentajes de estructura secundaria, ya que las sub-bandas correspondientes a las hélices, giros, láminas y lazos son mucho más anchas y están mucho más solapadas de lo que se esperaba (Brauner *et al.*, 2005).

La orientación de las proteínas en la bicapa lipídica se ha calculado tal y como se describe en el apartado 4.14.3 de Materiales y Métodos. Los ángulos de orientación obtenidos (Tabla 5) ponen de manifiesto que la proteína está integrada en la membrana tanto a pH 7.0 como a pH 5.0, observándose una pequeña variación en el ángulo (5°) a pH 5.0 para E2₆₆₁, E2 _{Δ 430} y E2 _{Δ 543}, mientras que esta variación no se produce en el caso de E2 _{Δ 603} y E2_{TM}. En el caso del ángulo de orientación de la hélice α en la membrana, se observan los mismos resultados que con las proteínas completas, la hélice α se encuentra integrada en la membrana a ambos valores de pH, aunque en este caso la variación del ángulo es más acusada al cambiar el pH de 7.0 a 5.0 con E2₆₆₁, E2 _{Δ 430} y E2 _{Δ 543} (entre 5° y 15°), sin que varíe con E2 _{Δ 603} y E2_{TM}. Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos en los espectros de diferencia.

Proteína	pH	% Estructura secundaria								α1	α 2
		Hélice α		Estructura β		No ordenada		Giro β			
		DMPG		DMPG		DMPG		DMPG			
		+	-	+	-	+	-	+	-		
E2 ₆₆₁	7.0	31	28	26	32	11	15	32	25	30°	15-20°
	5.0	26	20	34	41	8	22	32	17	25°	0-5°
E2 _{Δ430}	7.0	33	21	18	40	16	17	33	22	30°	20°
	5.0	29	27	22	44	26	13	23	16	25°	10-15°
E2 _{Δ543}	7.0	25	21	17	38	13	14	45	27	30°	15-20°
	5.0	31	24	24	36	12	7	33	33	25°	10-15°
E2 _{Δ603}	7.0	32	24	15	37	26	9	27	30	30°	20°
	5.0	33	10	26	41	12	27	29	22	30°	20°
E2 _{TM}	7.0	30	24	21	37	16	17	33	22	30°	20°
	5.0	29	17	23	37	15	24	32	22	30°	20°

Tabla 5. Datos obtenidos a partir de los espectros de FTIR-ATR de E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión a pH 7.0 y 5.0, en ausencia y en presencia de vesículas de DMPG. Se muestran los porcentajes de estructura secundaria calculados a partir de la banda amida I y los ángulos de orientación de las proteínas en la membrana calculados tal y como se describe en el apartado 4.14.3 de Materiales y Métodos. $\alpha 1$: ángulo de orientación de la proteína en la membrana; $\alpha 2$: ángulo de orientación de la hélice α en la membrana.

5.1.1.5. Caracterización funcional: Estudios de interacción lípido-proteína

Con objeto de determinar la contribución individual de cada péptido de fusión eliminado en los mutantes sencillos y la contribución conjunta de los tres péptidos eliminados en el triple mutante en las propiedades fusogénicas de E2₆₆₁, se llevaron a cabo estudios de desestabilización de vesículas de fosfolípidos.

Dichos estudios se han realizado empleando vesículas de fosfolípidos ácidos (PG), ya que la interacción de E2₆₆₁ con vesículas de fosfolípidos neutros (PC) es mucho más débil, y por tanto, su capacidad para desestabilizar vesículas es muy baja (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007).

5.1.1.5.1. Ensayos de agregación

La capacidad de los mutantes de fusión de E2₆₆₁ de inducir agregación de vesículas de PG se determinó midiendo el incremento de la densidad óptica a 360 nm producido como consecuencia de la dispersión originada por un aumento en el tamaño de las vesículas lipídicas.

La adición de las proteínas mutantes a vesículas de fosfolípidos ácidos provoca un aumento en la DO₃₆₀, reflejo del aumento de tamaño de las vesículas, tanto a pH 7.0 como a pH 5.0, de manera dependiente de la concentración de proteína. A pH 7.0 los datos obtenidos tras realizar tres experimentos independientes no fueron repetitivos (datos no mostrados) aunque se obtuvieron aumentos de DO₃₆₀ más bajos que a pH 5.0 (valores de DO₃₆₀ comprendidos entre 0.1 y 0.5). En cambio, a pH 5.0 los resultados obtenidos sí han sido repetitivos (Figura 25). Con todas las proteínas ensayadas, a partir de una concentración de proteína de 0.5 µM, se puede observar la agregación de las vesículas. En líneas generales, todos los mutantes de delección ensayados inducen menos agregación de vesículas que E2₆₆₁, siendo este efecto más acusado en el caso de E2_{Δ603} y E2_{TM}. En concreto, a una concentración de proteína de 3.5 µM E2_{Δ603} y E2_{TM} inducen un 25% y un 37% menos de agregación, respectivamente, en comparación con E2₆₆₁.

5.1.1.5.2. Mezcla de lípidos

E2₆₆₁ es capaz de inducir mezcla de lípidos en vesículas ácidas, tanto a pH 7.0 como a pH 5.0, siendo este efecto ligeramente mayor a pH ácido (Rodríguez M., Tesis doctoral, 2007). Con objeto de determinar si los mutantes de fusión de E2 conservan o no la capacidad del ectodominio completo de inducir la fusión de vesículas fosfolipídicas, se ha recurrido al ensayo clásico de

dilución de sondas fluorescentes, midiendo la transferencia de energía (RET) entre un par dador/aceptor (NBD-PE/Rh-PE) incorporados en una matriz lipídica (Struck *et al.*, 1981). La fusión de una vesícula marcada con otra sin marcar hace que la densidad superficial de las sondas disminuya, aumentando la distancia entre ellas y disminuyendo, por tanto, la transferencia de energía. A medida que aumenta la concentración de proteína disminuye la fluorescencia a 590 nm debida al aceptor (Rh), a la vez que aumenta la fluorescencia a 530 nm correspondiente al dador (NBD). El porcentaje de RET se calcula teniendo en cuenta la relación F_{590}/F_{530} obtenida a cada concentración de proteína y la curva de calibrado apropiada (Figura 26).

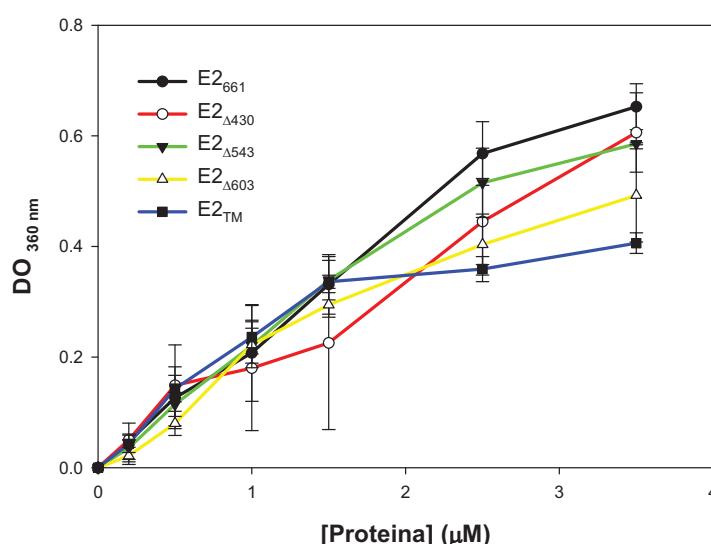


Figura 25. Variación de la densidad óptica a 360 nm inducida por la agregación de vesículas de PG al interaccionar con E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión. El tampón empleado fue *Medium Buffer* a pH 5.0. Los valores de la densidad óptica a 360 nm han sido medidos tras incubar 15 min a 37 °C la preparación de vesículas, a una concentración 0.14 mM, con diferentes concentraciones de proteína. El valor que se representa es la diferencia entre el valor alcanzado en cada caso y el de un blanco que sólo contiene fosfolípidos. Se muestra la media y la desviación estándar de los datos obtenidos en al menos tres experimentos independientes.

A pH 7.0 se han obtenido resultados poco repetitivos al igual que ha ocurrido en el caso de los ensayos de agregación, aunque la tendencia general de los datos indica que a este pH todos los mutantes son capaces de inducir

mezcla de lípidos en vesículas de PG, siendo menor su efecto que a pH 5.0 (datos no mostrados). Los resultados obtenidos a pH 5.0 muestran que tanto E2₆₆₁ como los mutantes de delección simples, producen una disminución del %RET desde el 70% en ausencia de proteína, hasta un 10% para una concentración final de proteína de 3.5 μ M. Estos valores corresponden a una dilución de la densidad superficial de aceptor de unas 10 veces, lo que indica que se ha producido la fusión completa de las vesículas, ya que la mera agregación de las mismas no daría cuenta de esta disminución en la transferencia de energía (Blumenthal *et al.*, 1983). En cambio, en el caso de E2_{TM}, la disminución del %RET llega hasta el 20% a la misma concentración de proteína, lo que indica una dilución de sonda de unas 6 veces, no siendo total la fusión de las vesículas. Por tanto, es la contribución conjunta de los tres péptidos fusogénicos la que provoca la disminución de la capacidad fusogénica de E2, aunque no se puede descartar que las variaciones estructurales observadas puedan estar influyendo en este resultado.

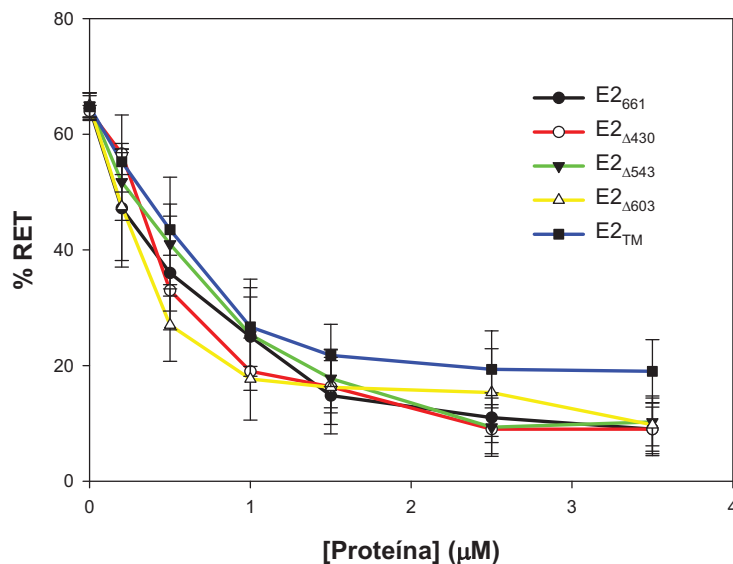


Figura 26. Mezcla de lípidos en vesículas de PG inducida por la interacción con E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión a pH 5.0. La proteína se añade a una mezcla 1:9 de vesículas marcadas (NBD-PE (1%), Rh-PE (0.8%)): vesículas sin marcar. La concentración final de fosfolípido fue 0.14 mM. El %RET se calcula a partir de las intensidades de fluorescencia medidas a 530 y 590 nm de la curva de calibrado. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en al menos tres experimentos independientes.

En vista de los resultados poco repetitivos obtenidos en los experimentos de agregación y mezcla de lípidos a pH 7.0, los siguientes ensayos de interacción lípido-proteína se han realizado únicamente a pH 5.0.

5.1.1.5.3. Liberación de contenidos acuosos

El aumento de la permeabilidad de las vesículas inducido por la adición de la proteína E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión, se ha estudiado siguiendo el ensayo descrito por Ellens (Ellens *et al.*, 1985). La interacción de la proteína con vesículas que llevan coencapsulados un fluoróforo (ANTS) y su apagador (DPX) produce una desaparición de la integridad física de las vesículas. Esto conlleva una dilución del fluoróforo y del apagador, aumentando, por tanto, la intensidad de fluorescencia.

Como se observa en la Figura 27, el valor de fluorescencia máximo obtenido (70%) para todas las proteínas se alcanza a una concentración de proteína de 1.2 a 2 μ M, menor que la requerida en los ensayos de agregación y mezcla de lípidos. Además no se observan grandes diferencias en el comportamiento de E2 cuando se deletan las regiones fusogénicas.

En cuanto a la cinética del proceso de liberación del contenido acuoso de las vesículas, se observa que la velocidad de liberación es muy similar a la de E2₆₆₁ en el caso de los mutantes de fusión sencillos, y algo más lenta en caso del triple mutante, aunque se llega al mismo porcentaje de F_{\max} tras 900 segundos.

5.1.1.5.4. Polarización de fluorescencia

Los estudios de polarización de fluorescencia se han realizado utilizando las sondas fluorescentes 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 1-(4(trimetilamonio)fenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) que se localizan en zonas internas y más superficiales de la bicapa lipídica, respectivamente. El objetivo de este tipo de estudios es determinar el efecto de la proteína en el comportamiento termotrópico de los fosfolípidos para, así, conocer si la proteína se inserta, y cómo, en la bicapa y el tipo de fuerzas que determinan la

interacción proteína-lípido. Se ha estudiado el efecto de E2₆₆₁ y E2_{TM} sobre las curvas de transición de fase de vesículas de DMPG marcadas con DPH y con TMA-DPH a pH 5.0. Dado que en los experimentos de agregación, mezcla de lípidos y liberación de contenidos acuosos, los mutantes de fusión sencillos no mostraron variaciones importantes en su interacción con las vesículas fosfolipídicas, únicamente se ha estudiado el efecto de E2_{TM}, ya que es el mutante para el que se han obtenido resultados más diferentes con respecto a E2₆₆₁.

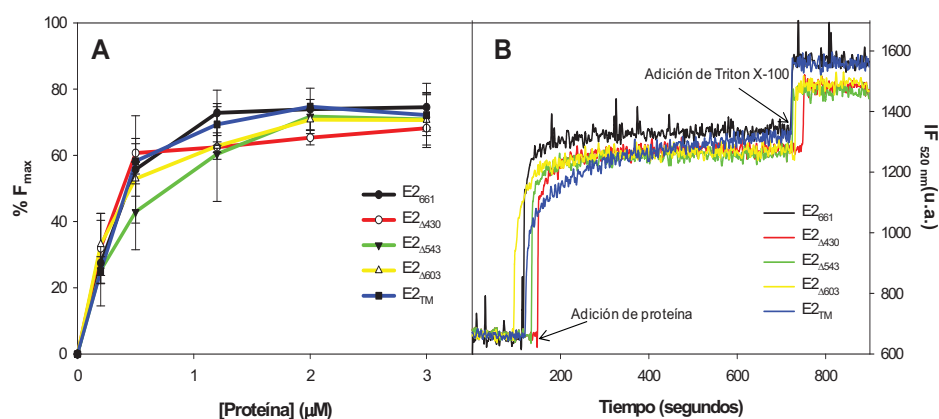


Figura 27. Liberación del contenido interno de vesículas de PG inducido por la adición de E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión a pH 5.0. A las vesículas de PG, en las que se han coencapsulado el fluoróforo ANTS y su desactivador colisional DPX, se les añade la proteína a la concentración deseada y se registra el aumento de fluorescencia a 520 nm debida al ANTS, a 37 °C con agitación constante. El valor de 100% de liberación se obtiene mediante adición de Triton X-100 al 0.5%, siendo el valor de 0% el obtenido al añadir tampón. A) Porcentaje de liberación de contenidos acuosos en función de la concentración de proteína añadida. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en tres experimentos independientes. B) Cinéticas de liberación de contenidos acuosos a una concentración de proteína de 1.2 μM.

El DPH es una sonda hidrofóbica que se inserta en el interior de la bicapa lipídica, proporcionando información de los extremos de las cadenas de acilo (Lentz *et al.*, 1976). La interacción de E2₆₆₁ y E2_{TM} con fosfolípidos ácidos, como el DMPG a pH 5.0, afecta al comportamiento termotrópico de éstos, observándose una disminución de la amplitud de la transición de fase del fosfolípido (Figura 28A). El efecto es más acusado a temperaturas por encima de la temperatura de transición de fase (T_m), lo que significa que la proteína afecta

principalmente a las cadenas de acilo que se encuentran en el estado líquido cristalino, induciendo un mayor orden en el empaquetamiento de estas cadenas, lo que da lugar a un considerable aumento en el valor de la polarización de fluorescencia. También se observa un sensible aumento en la temperatura de transición de fase, de 23.0 a 25.0 °C a pH 5.0 (Tabla 6). El comportamiento de ambas proteínas es muy similar siendo ligeramente más acusado el efecto de E2₆₆₁ sobre la transición de fase del DMPG.

El TMA-DPH es una sonda más hidrofílica que se localiza interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos y proporciona información de los carbonos 1-8 de las cadenas de acilo (Prendergast *et al.*, 1981). Los estudios de polarización de fluorescencia con DMPG-TMA-DPH muestran resultados similares a los observados con el DPH a pH 5.0, es decir, se observa una disminución de la amplitud de la transición y un ligero aumento de la T_m con ambas proteínas de 1 °C (Figura 28B y Tabla 6), siendo el efecto muy similar con ambas proteínas.

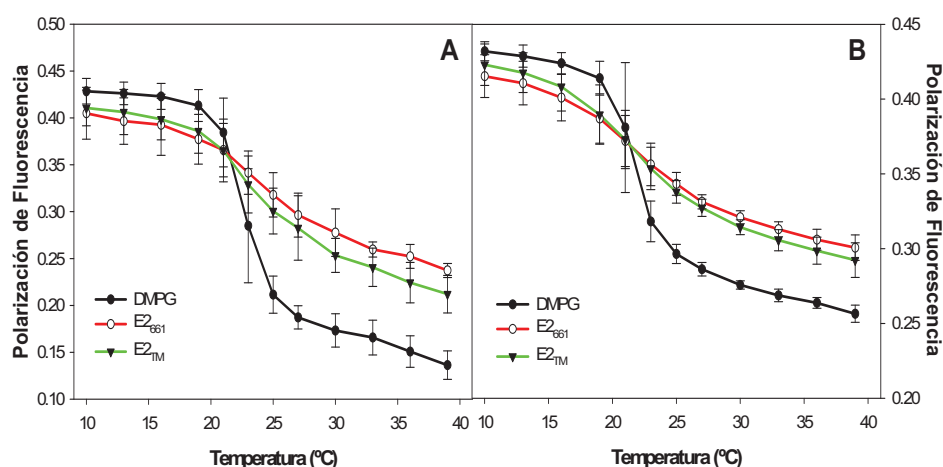


Figura 28. Curvas de transición de fase de vesículas de DMPG marcadas con DPH (A) o con TMA-DPH (B) en presencia de E2₆₆₁ y E2_{TM}. La relación sonda:fosfolípido empleada fue 1:500 en el caso del DPH y 1:100 en el caso de TMA-DPH. Las vesículas de fosfolípido (0.14 mM) se incuban con la proteína durante 30 min a 37°C en *Medium buffer* a pH 5.0. A continuación se mide la polarización de fluorescencia a cada temperatura. La relación proteína:lípido empleada ha sido 1:50. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en tres experimentos independientes.

PROTEÍNA	T _m DMPG-DPH (°C)	T _m DMPG-TMA-DPH (°C)
Sin proteína	23.0	22.1
E2 ₆₆₁	25.3	23.2
E2 _{TM}	24.7	22.9

Tabla 6. Temperaturas de transición de fase de vesículas de DMPG marcadas con DPH y TMA-DPH a pH 5.0 en presencia de E2₆₆₁ y E2_{TM}.

5.1.2. MUTANTE DE FUSIÓN SEGÚN EL PATRÓN DE PUENTES DISULFURO: E2_{Δ502}

Recientemente, ha sido publicado el posible patrón de los 9 puentes disulfuro que forman los 18 residuos de Cys presentes en la proteína E2 (Krey *et al*, 2010). Con estos y otros datos funcionales importantes, se han impuesto una serie de restricciones al posible plegamiento de la proteína, lo cual ha permitido establecer un modelo de plegamiento empleando como molde la estructura cristalina de proteínas de fusión tipo II de las familias de alfa y flavivirus, en el cual se han introducido los elementos de estructura secundaria de la proteína E2 del HCV. Este modelo ha permitido establecer la localización de otro posible candidato a péptido de fusión tipo II: la región de aminoácidos 502-520, que es una región altamente conservada entre todos los genotipos del HCV, rica en aminoácidos no polares y en glicocola.

Con esta información, se procedió al diseño de otro mutante de fusión de E2₆₆₁ en el que se han deletado los aminoácidos 502 a 520, E2_{Δ502}.

5.1.2.1. Clonación

Al igual que se ha descrito en el caso de los mutantes de fusión del apartado 5.1.1, se ha seguido el método descrito por Pogulis y col. (1996) (ver Figura 17). El molde usado ha sido el mismo: pAcGP67-A-E2₆₆₁ con una

La proteína ha sido purificada a partir del medio extracelular de las células de insecto mediante cromatografía de afinidad con una columna de Ni-NTA-agarosa. Durante el proceso de purificación prácticamente toda la proteína es retenida en la columna, y su elución con imidazol 200 mM permite obtener, tras su diálisis frente a un tampón adecuado, unos 7 mg de proteína por litro de cultivo, con un alto grado de pureza (Figura 30).

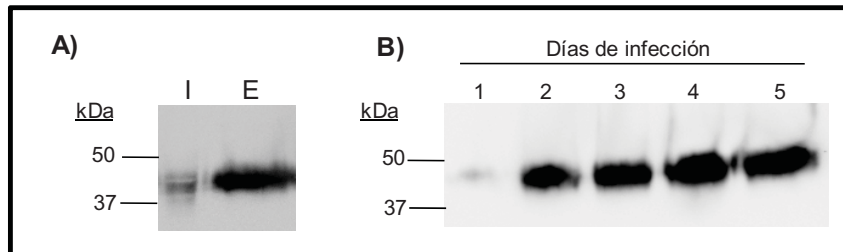


Figura 29. Expresión de $E2_{\Delta 502}$ en células de insecto (Tni). A) Expresión intracelular (I) y en el sobrenadante o extracelular (E), tras 5 días de infección. B) Expresión en función de los días de infección. La detección se ha realizado con anticuerpo monoclonal anti-6His.

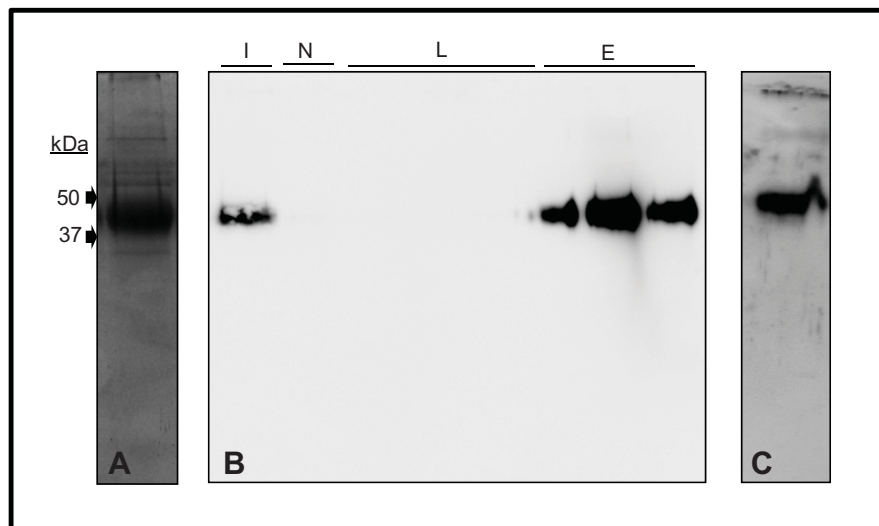


Figura 30. Purificación de $E2_{\Delta 502}$. Panel A) Tinción con azul de Coomassie de la proteína purificada. Panel B) Inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-6His de la proteína purificada. I: medio inicial; N: no retenido; L: lavados con tampón con imidazol 10 y 20 mM; E: elución con tampón con imidazol 200 mM. Panel C) Inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-E2 de cabra de la proteína purificada y dializada.

La masa molecular experimental de la proteína es unos 15 kDa mayor que la teórica calculada a partir de la secuencia de aminoácidos. Estas diferencias, al igual que en caso de $E2_{661}$, son debidas a las glicosilaciones de la proteína.

La composición de aminoácidos obtenida a partir del análisis de aminoácidos coincide con la composición teórica deducida a partir de la

secuencia de nucleótidos de su ADN codificante. Para el cálculo de la concentración de esta proteína en todos los experimentos realizados, se ha usado el coeficiente de extinción experimental calculado a partir de estos análisis de aminoácidos ($E^{0.1\%} = 2.2$), que resultó ser bastante similar al teórico ($E^{0.1\%} = 2.4$).

5.1.2.3. Caracterización estructural

5.1.2.3.1. Caracterización espectroscópica

Con el fin de comprobar si se produjeron cambios estructurales importantes al delecionar el péptido fusogénico de E2₆₆₁ que comprende los residuos 502-520, se emplearon técnicas espectroscópicas como el dicroísmo circular y la emisión de fluorescencia.

A) Espectros de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de E2_{Δ502} presenta un mínimo en torno a 206 nm, con una elipticidad molar por residuo de $-7200 \text{ grado}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$, indicativo de la existencia de un porcentaje relativamente alto de estructura aperiódica (Figura 31A). Se trata de una proteína con un elevado porcentaje de estructura tipo extendido, al igual que E2₆₆₁.

Los porcentajes de estructura secundaria experimentales y teóricos se han calculado de la misma manera que en el caso de los mutantes de fusión según el perfil de hidrofobicidad y se recogen en la Tabla 7. Al igual que en el caso de E2₆₆₁, se observa que el contenido en estructura β que se obtiene de los datos experimentales es mayor, aunque con ambos métodos se obtiene un elevado porcentaje de estructura no ordenada y la estructura ordenada mayoritaria es la de tipo extendido.

Por otro lado, en el espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo se observa un desplazamiento con respecto al mínimo a 270 nm y el pico a 288 nm que aparecen en el espectro de E2₆₆₁, estando éstos en torno a 278 y 291 nm, respectivamente. Este efecto podría ser debido a la eliminación

de la Tyr 510 en el mutante (Figura 31B). Además, la elipticidad molar por residuo experimenta una disminución considerable en valor absoluto, lo que implicaría que el residuo anterior es muy importante en la estructura de la proteína. Por tanto, la eliminación de la región 502-520 en el mutante E2 $_{\Delta 502}$ parece provocar una variación en la estructura terciaria de E2, aunque sin afectar a la estructura secundaria.

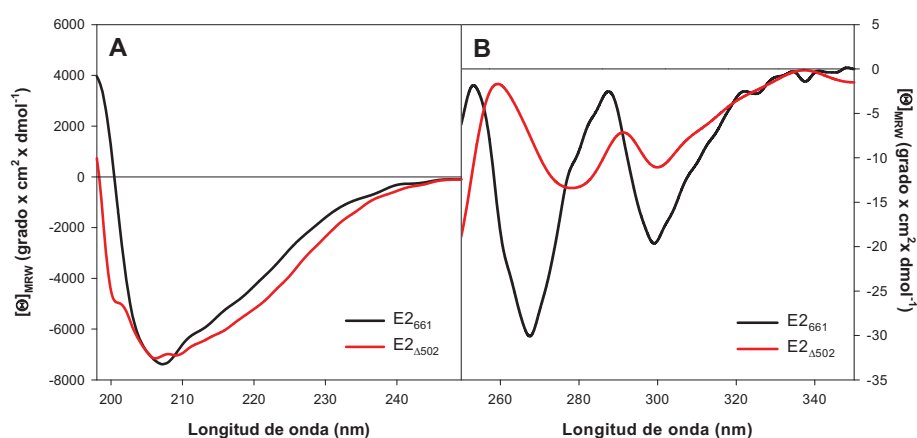


Figura 31. Espectros de dicroísmo circular de E2 $_{661}$ y E2 $_{\Delta 502}$ en el UV-lejano (A) y en el UV-próximo (B). Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM. La concentración de proteína empleada es 0.15 mg/ml y el paso óptico 0.1 cm (A) y 0.5 mg/ml y paso óptico de 0.5 cm (B). Ambos espectros son el resultado de 5 acumulaciones y han sido corregidos frente a las contribuciones del tampón.

% Estructura secundaria	E2 $_{661}$		E2 $_{\Delta 502}$	
	E	T	E	T
Hélice α	12	2	12	2
Estructura β	47	34	44	34
No ordenada	41	64	44	64

Tabla 7. Porcentajes de estructura secundaria de E2 $_{\Delta 502}$ comparados con los de E2 $_{661}$. Los porcentajes de estructura secundaria experimentales (E) fueron obtenidos aplicando el método CCA (Perczel *et al.*, 1991) al espectro de dicroísmo circular, mientras que los teóricos (T) se obtuvieron mediante el método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) para tres componentes.

B) Espectros de emisión de fluorescencia

El espectro de emisión de fluorescencia a pH 7.0 de E2 Δ 502 presenta un máximo en torno a los 333 nm, tanto al excitar las moléculas a 275 nm como a 295 nm (Figura 32), lo que indica que los Trp de la proteína se encuentran en un microentorno relativamente poco hidrofóbico. Además, la contribución de los residuos de tirosina es muy baja, siendo inferior que en el caso de E2 Δ 661, posiblemente debido a la eliminación de la Tyr 510 en el mutante.

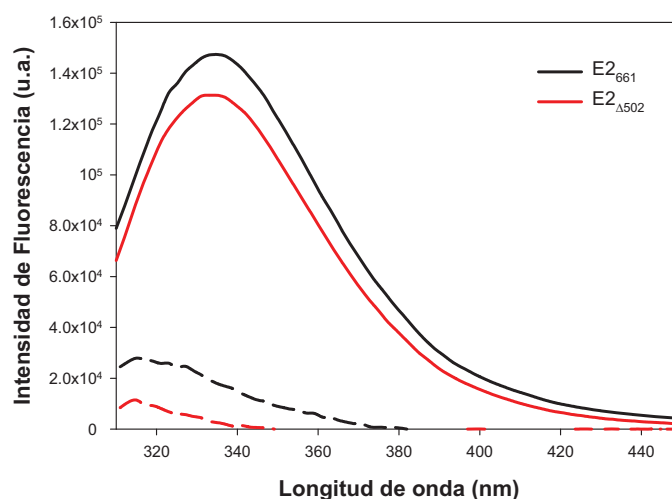


Figura 32. Espectros de emisión de fluorescencia de E2 Δ 502 en comparación con E2 Δ 661. Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM a una concentración de 0.05 mg/ml. Se muestran los espectros obtenidos al excitar con una longitud de onda de 275 nm (—), y la contribución de las tirosinas (---), calculada según se describe en el apartado 4.13.1 de Materiales y Métodos.

5.1.2.3.2. Caracterización del estado de oligomerización

Como se observa en la Figura 33, existen algunas variaciones en el estado de oligomerización de E2 Δ 502 con respecto a E2 Δ 661. Ambas proteínas migran como una única banda en condiciones desnaturalizantes y reductoras, mientras que cuando se preservan los puentes disulfuro, migran en forma oligomérica, siendo muy baja la proporción de monómero y dímero en E2 Δ 502 con respecto a E2 Δ 661. En el caso de E2 Δ 502, la mayor parte de la proteína está

formando oligómeros de tres o más unidades en los que los monómeros se asocian, al menos, mediante la formación de puentes disulfuro.

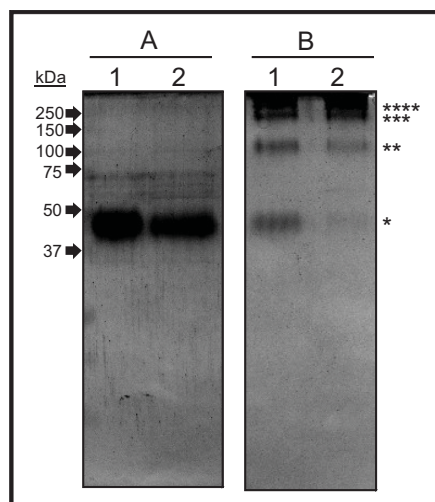


Figura 33. PAGE-SDS al 15% de E2₆₆₁ y E2_{Δ502} en (A) presencia de SDS 1% (p/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v) y (B) en condiciones no reductoras. (1) E2₆₆₁; (2) E2_{Δ502}. (*) Monómero; (**) Dímero; (***) Trímero; (****) Tetrámero.

5.1.2.3.3. Caracterización antigénica

Se ha estudiado la capacidad antigénica del mutante E2_{Δ502} utilizando una serie de sueros de pacientes infectados por el HCV, así como de pacientes negativos al HCV mediante enzimoimmunoensayo. Como se muestra en la Figura 34, la proteína E2_{Δ502} en condiciones nativas no es reconocida por los anticuerpos presentes en ninguno de los sueros positivos empleados. Este resultado coincide con la observación de una modificación de la estructura terciaria de la proteína en los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo.

Se comprobó también mediante enzimoimmunoensayo si E2_{Δ502} era reconocida por el anticuerpo monoclonal conformacional H53, de la misma manera que se hizo con los mutantes de fusión del apartado 5.1.1 de resultados,

observándose que este mutante no es reconocido por dicho anticuerpo (datos no mostrados).

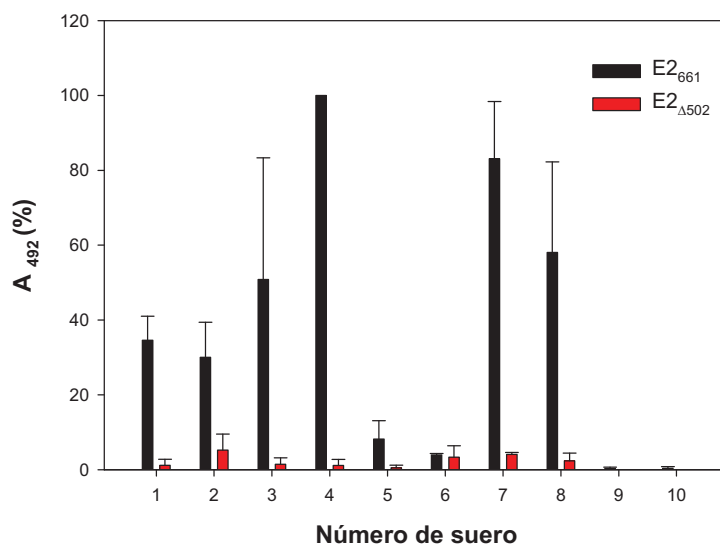


Figura 34. ELISA con los sueros de pacientes infectados por el HCV (sueros 1 a 8) y de pacientes sanos (sueros 9 y 10) para la detección de E2₆₆₁ y E2_{Δ502}. El ensayo se realizó tapizando las placas con 0.1 µg de proteína/pocillo y con los sueros diluidos 1:100-1:500. Se ensayaron un total de 8 sueros negativos y todos proporcionaron la misma absorbancia que los sueros 9 y 10. El valor del 100% de A₄₉₂ ha sido asignado a la absorbancia proporcionada por E2₆₆₁ con el suero n°4, por ser el valor máximo obtenido con esta proteína. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Por tanto, los resultados obtenidos en la caracterización estructural del mutante E2_{Δ502} parecen indicar que éste ha perdido la estructura terciaria original de E2₆₆₁, y además, presenta un alto grado de agregación. Por ello, la caracterización funcional de este mutante mediante su interacción con lípidos no se ha llevado a cabo.

5.1.3. IMPLICACIÓN DE E1 EN LAS PROPIEDADES FUSOGÉNICAS: E2_{TM}E1

Existen evidencias experimentales que demuestran que es necesaria la presencia conjunta de E1 y E2 para obtener la máxima actividad fusogénica (Takikawa *et al.*, 2000). Con el objetivo de estudiar el efecto que pueda ejercer la glicoproteína E1 en el proceso de fusión y determinar si es necesaria o no su presencia para el correcto funcionamiento de E2, se ha diseñado un mutante en que se ha añadido la secuencia del ectodominio de E1 tras la de E2_{TM}, ya que éste es el único mutante que ha presentado una disminución en las propiedades fusogénicas respecto a E2₆₆₁.

Se ha añadido la secuencia del ectodominio de E1 tras la del ectodominio de E2 debido a que, en estudios anteriores (Tello D., Tesis doctoral, 2008), se demostró que la expresión y rendimiento de purificación de los ectodominios E2E1 en células de insecto es superior a la de E1E2 (Tello *et al.*, 2010) sin que se modifique su comportamiento en cuanto a estructura ni a función. Ambos ectodominios se encuentran unidos por una secuencia espaciadora flexible de 21 aminoácidos.

5.1.3.1. Clonación

Al igual que en caso de los mutantes de fusión descritos en los apartados 5.1.1 y 5.1.2, se ha seguido el método descrito por Pogulis y col. (1996). En este caso se han usado dos moldes distintos: pAcGP67A-E2_{TM}, obtenido anteriormente tal y como se describe en el apartado 5.1.1.1, y pAcGP67A-E2E1, que incluye las secuencias de los ectodominios de E2 y E1 completos (Tello, D., Tesis doctoral, 2008). Por un lado, utilizando como molde pAcGP67A-E2_{TM} y con los oligonucleótidos Gp67 (+) y E2DEL603 (-), se amplifica mediante PCR la secuencia de E2_{TM} hasta la tercera delección (residuo 603). Por otro lado, utilizando como molde pAcGP67A-E2E1 y con los oligonucleótidos E2DEL603 (+) y Gp67 (-), se amplifica mediante PCR la región comprendida desde el aminoácido 624 de E2 hasta el final de E1. Una vez obtenidos ambos fragmentos de ADN se realiza una segunda PCR de elongación sin cebadores y una tercera PCR para amplificar el ADN codificante del mutante que se liga en el

plásmido pAcGP67-A, mediante digestión con *Bam*HI/*Not* I, y posterior ligación en el vector.

5.1.3.2. Expresión y purificación

Tras la obtención de los baculovirus recombinantes, se llevó a cabo su purificación y amplificación de manera análoga a los mutantes de fusión anteriores. Mediante inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-6His se evaluó la expresión de proteína en el sedimento y en el sobrenadante en el 5º día de infección (Figura 35A), comprobándose que una gran cantidad de proteína es secretada al medio extracelular. Al detectar la cantidad de proteína en el sobrenadante en función de los días de infección, se comprobó que la secreción de proteína es máxima entre el cuarto y el quinto día de infección (Figura 35B).

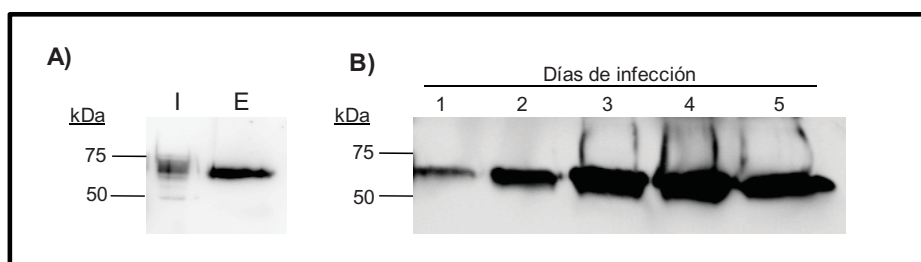


Figura 35. Expresión de E2_{TM}E1 en células de insecto (Tni). A) Expresión intracelular (I) y en el sobrenadante o extracelular (E). B) Expresión en función de los días de infección. La detección se ha realizado con un anticuerpo monoclonal anti-6His.

La proteína ha sido purificada a partir del medio extracelular de las células de insecto mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de Ni-NTA-agarosa. Durante el proceso de purificación prácticamente toda la proteína es retenida en la columna, y su elución con imidazol 200 mM permite obtener unos 7 mg de proteína por litro de cultivo, con un alto grado de pureza (Figura 36). La masa molecular experimental de la proteína es unos 20 kDa mayor que la teórica calculada a partir de las secuencia de aminoácidos debido a que se encuentra altamente glicosilada.

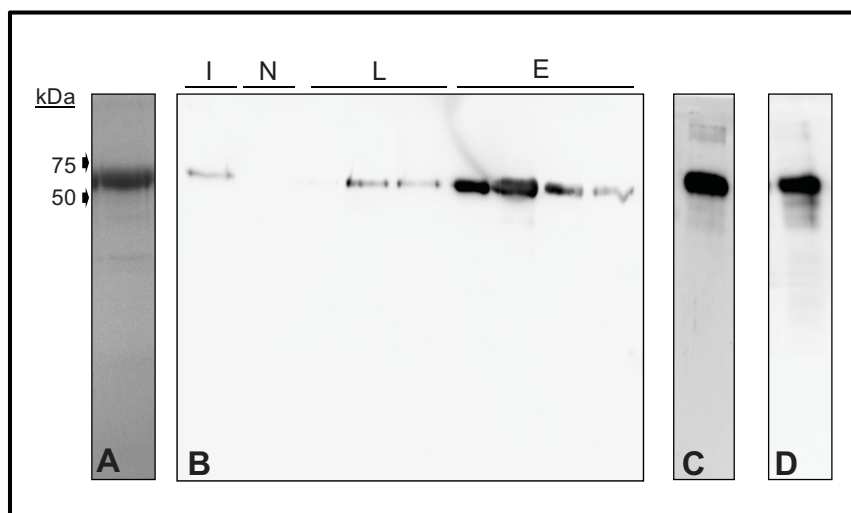


Figura 36. Purificación de E2_{TM}E1. Panel A) Tinción con azul de Coomassie de la proteína purificada. Panel B) Inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-6His de la proteína purificada. I: medio inicial; N: no retenido; L: lavados con tampón con imidazol 10 y 20 mM; E: elución con tampón con imidazol 200 mM. Panel C) Inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-E2 de cabra de la proteína purificada y dializada. Panel D) Inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-E1 (A4) de la proteína purificada y dializada.

La composición de aminoácidos de E2_{TM}E1 que se ha obtenido a partir del análisis de aminoácidos coincide con la teórica deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de su ADN codificante. El coeficiente de extinción experimental calculado a partir de estos análisis ($E^{0.1\%} = 1.6$), y que se ha usado para el cálculo de las concentraciones de proteína en todos los experimentos realizados, es bastante parecido al teórico ($E^{0.1\%} = 1.75$).

5.1.3.3. Caracterización estructural

5.1.3.3.1. Caracterización espectroscópica

La caracterización espectroscópica de este mutante se ha llevado a cabo mediante dicroísmo circular, en el ultravioleta próximo y en el ultravioleta lejano, y espectroscopía de fluorescencia.

A) Espectros de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular de E2_{TM}E1 en el ultravioleta lejano presenta un mínimo en torno a 206 nm, con una elipticidad molar por residuo de -5800 grado·cm²·dmol⁻¹, indicativo de la existencia de un porcentaje relativamente alto de estructura aperiódica (Figura 37). Los porcentajes de estructura secundaria experimentales y teóricos se han calculado de la misma manera que en el caso de los mutantes de fusión anteriores y se recogen en la Tabla 8. Se trata de una proteína con un elevado contenido en estructura aperiódica, siendo la de tipo extendido la estructura ordenada mayoritaria. Comparando los datos experimentales obtenidos con los de E2E1 no se observan variaciones en cuanto a estructura secundaria.

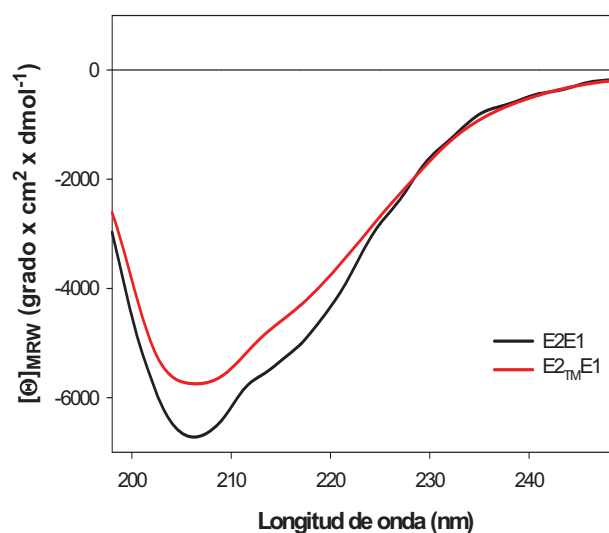


Figura 37. Espectros de dicroísmo circular de E2E1 y E2_{TM}E1 en el UV-lejano. Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM. La concentración de proteína empleada es 0.15 mg/ml y el paso óptico 0.1 cm. Ambos espectros son el resultado de 5 acumulaciones y han sido corregidos frente a las contribuciones del tampón.

% Estructura secundaria	E2E1		E2 _{TM} E1	
	E	T	E	T
Hélice α	10	8	8	10
Estructura β	46	32	50	31
No ordenada	44	60	42	59

Tabla 8. Porcentajes de estructura secundaria de E2_{TM}E1 comparados con los de E2E1. Los porcentajes de estructura secundaria experimentales (E) fueron obtenidos aplicando el método CCA (Perczel *et al.*, 1991) al espectro de dicroísmo circular, mientras que los teóricos (T) se obtuvieron mediante el método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) para tres componentes.

B) Espectros de emisión de fluorescencia

El espectro de emisión de fluorescencia a pH 7.0 de E2_{TM}E1 presenta un máximo en torno a los 333 nm cuando se excitan las moléculas tanto a 275 nm como a 295 nm (Figura 38), lo que indica que los Trp de la proteína se encuentran en un microentorno relativamente poco hidrofóbico. Además, la contribución de los residuos de tirosina es muy baja, al igual que en el caso de E2E1. Los espectros de ambas proteínas son prácticamente idénticos, lo que indica que no se han producido alteraciones en el microentorno de los residuos de Tyr y Trp.

5.1.3.3.2. Caracterización del estado de oligomerización

Como se observa en la Figura 39, E2_{TM}E1 presenta un patrón de oligomerización similar al de E2E1. Ambas proteínas migran como una única banda en condiciones desnaturalizantes y reductoras, y en forma de oligómeros (monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros) en condiciones no reductoras. El patrón de oligomerización obtenido es similar en ambas proteínas, siendo muy baja la proporción de monómero.

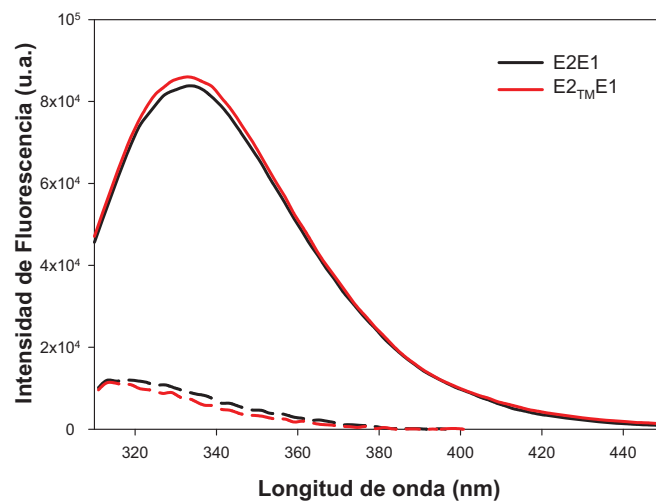


Figura 38. Espectros de emisión de fluorescencia de E2_{TM}E1 en comparación con E2E1. Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM a una concentración de 0.05 mg/ml. Se muestran los espectros obtenidos al excitar con una longitud de onda de 275 nm (—), y la contribución de las tirosinas (---), calculada según se describe en el apartado 4.13.1 de Materiales y Métodos.

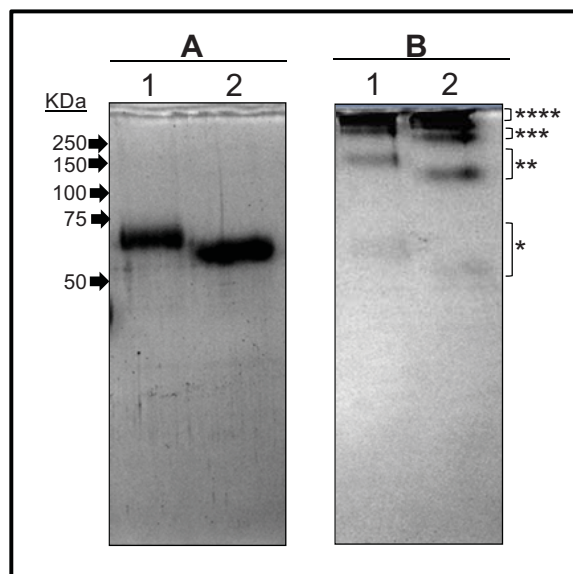


Figura 39. PAGE-SDS al 15% de E2E1 y E2_{TM}E1 en (A) presencia de SDS 1% (p/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v) y (B) en condiciones no reductoras. (1) E2E1; (2) E2_{TM}E1. (*) Monómero; () Dímero; (***) Trímero; (****) Tetrámero.**

5.1.3.3.3. Caracterización antigénica

La proteína E2_{TM}E1 ha sido caracterizada antigénicamente mediante la utilización de una serie de sueros de pacientes infectados por el HCV, así como de pacientes negativos al HCV mediante enzimoimmunoensayo. Como se muestra en la Figura 40, E2_{TM}E1 en condiciones nativas es reconocida débilmente por los anticuerpos presentes en 3 de los 8 sueros positivos empleados, mientras que E2E1 es reconocida por 6 de estos 8 sueros. Este resultado coincide con el observado en el caso de E2_{TM} (Figura 23), por lo que E1 apenas es reconocida por los sueros positivos ensayados, siendo E2 la principal responsable de las propiedades antigénicas. No obstante, el débil reconocimiento del mutante E2_{TM}E1 observado por los sueros 1, 4 y 7, que no se observa en el caso de E2_{TM}, podría deberse a E1.

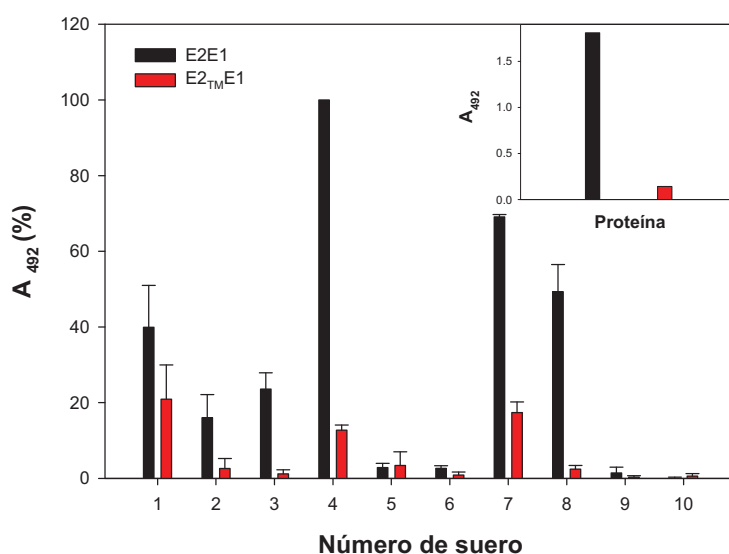


Figura 40. ELISA con los sueros de pacientes infectados por el HCV (sueros 1 a 8) y de pacientes sanos (sueros 9 y 10) para la detección de E2E1 y E2_{TM}E1. El ensayo se realizó tapizando las placas con 0.1 µg de proteína/pocillo y con los sueros diluidos 1:100-1:500. Se ensayaron un total de 8 sueros negativos y todos proporcionaron la misma absorbancia que los sueros 9 y 10. El valor del 100% de A₄₉₂ ha sido asignado a la absorbancia proporcionada por E2₆₆₁ con el suero nº 4, por ser el valor máximo obtenido con esta proteína. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes. Recuadro interior: ELISA con H53. Este ensayo se ha realizado tal y como se indica en el apartado 4.8.2 de Materiales y Métodos.

Se comprobó también mediante ensayo de inmunoenlace si E2_{TM}E1 era reconocida por el anticuerpo conformacional H53, observándose que este mutante es muy débilmente reconocido por dicho anticuerpo (Figura 40, recuadro interior). Esto puede indicar, al igual que en el caso de E2_{TM}, que la conformación de la proteína E2 ha cambiado o bien que se ha eliminado total o parcialmente el epítipo reconocido por H53.

5.1.3.4. Caracterización funcional: Estudios de interacción lípido-proteína

Al igual que con el resto de mutantes de fusión, se han llevado a cabo estudios de desestabilización de vesículas de fosfolípidos con vesículas de PG.

5.1.3.4.1. Ensayos de agregación

Se ha medido la capacidad de E2_{TM}E1 de inducir agregación de vesículas de PG a pH 5.0 y a pH 7.0, comprobándose que dicho mutante interacciona con las vesículas de PG y provoca su agregación. A pH 5.0 (Figura 41) los valores de agregación obtenidos son muy similares a los obtenidos con E2E1 y con E2₆₆₁ y, por tanto, superiores a los obtenidos en el caso de E2_{TM} (ver Figura 25), lo que podría indicar un posible efecto de E1 en el proceso de agregación, que actuaría compensando la disminución en la agregación producida por la eliminación de las regiones fusogénicas de E2.

A pH 7.0 los datos obtenidos tras realizar varios experimentos independientes no fueron repetitivos en el caso de E2_{TM}E1 (datos no mostrados) aunque se obtuvieron aumentos de DO₃₆₀ más bajos que a pH 5.0 (valores de DO₃₆₀ comprendidos entre 0.07 y 0.35 a una concentración de proteína de 2 µM). En el caso de E2E1 no hay agregación con vesículas de PG a pH 7.0, resultado obtenido ya anteriormente (Tello D., Tesis Doctoral, 2008).

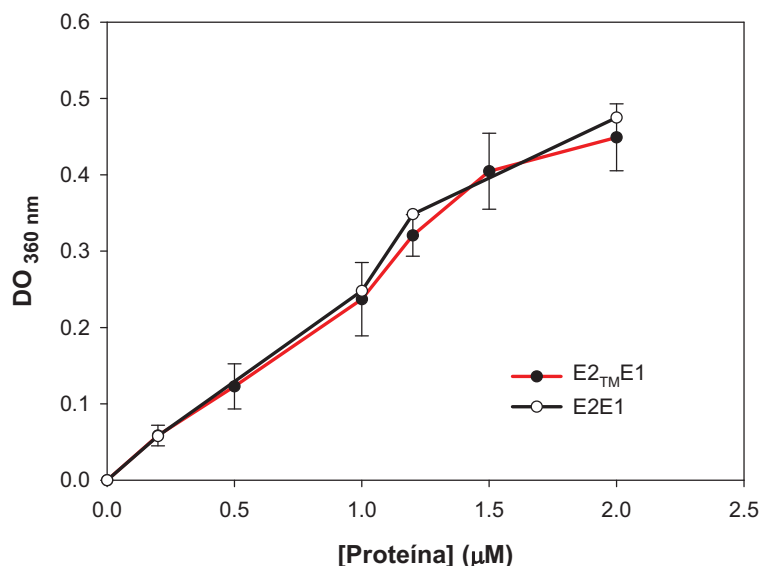


Figura 41. Variación de la densidad óptica a 360 nm inducida por la agregación de vesículas de PG al interactuar con E2E1 y E2_{TM}E1. Como proteína control se ha usado E2E1. El tampón empleado fue *Medium Buffer* a pH 5.0. Los valores de la densidad óptica a 360 nm han sido medidos tras incubarse 15 min a 37 °C la preparación de vesículas, a una concentración 0.14 mM, con diferentes concentraciones de proteína. El valor que se representa es la diferencia entre el valor alcanzado en cada caso y el de un blanco que sólo contiene fosfolípidos. Se muestra la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes.

5.1.3.4.2. Mezcla de lípidos

Los resultados obtenidos (Figura 42) muestran que E2_{TM}E1 produce una disminución del %RET desde el 68% en ausencia de proteína, hasta un 20% a pH 5.0, para una concentración final de proteína de 2.0 μM. Estos valores corresponden a una dilución de la densidad superficial de aceptor de unas 6 veces, lo que indica que no se ha producido la fusión completa de las vesículas. Con E2E1 la dilución de aceptor es de unas 10 veces, lo que indica que la fusión de las vesículas es total. En cambio, a pH 7.0 apenas se produce fusión con ambas proteínas.

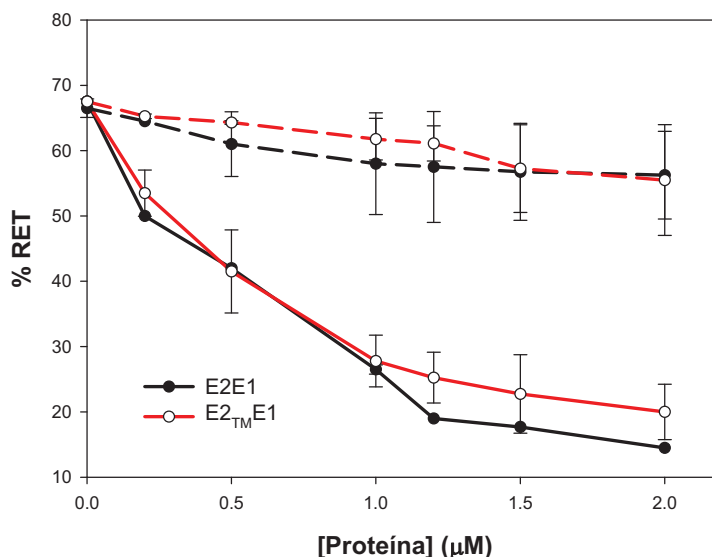


Figura 42. Mezcla de lípidos en vesículas de PG inducida por la interacción con E2E1 y E2_{TM}E1 a pH 5.0 (—) y a pH 7.0 (---). La proteína se añade a una mezcla 1:9 de vesículas marcadas (NBD-PE (1%), Rh-PE (0.8%)): vesículas sin marcar. La concentración final de fosfolípido fue 0.14 mM. El %RET se calcula a partir de las intensidades de fluorescencia medidas a 530 y 590 nm de la curva de calibrado. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Estos resultados indican, por un lado, que a pH 5.0 el comportamiento de E2_{TM}E1 es similar al de E2_{TM} (Figura 26), lo que sugiere que aparentemente E1 no interviene directamente en el proceso de fusión. Por otro lado, en el caso de las construcciones basadas en el ectodominio de E2 aislado, a pH 7.0 sigue habiendo fusión aunque no se llegan a los valores de dilución de sonda observados a pH 5.0, mientras que E2E1 y E2_{TM}E1 apenas inducen fusión a pH 7.0 (Figura 42). Esto indicaría una posible implicación de E1 en la modulación del cambio conformacional que se produciría en E2 a pH ácido, y que permitiría la exposición de sus péptidos fusogénicos.

5.1.3.4.3. Liberación de contenidos acuosos

Estudios previos (Tello D., Tesis doctoral, 2008), demostraron que la capacidad de E2E1 para inducir liberación de contenidos acuosos es

independiente del pH. Por tanto, este ensayo se ha realizado únicamente a pH 5.0.

Como se observa en la Figura 43, el valor de fluorescencia máximo obtenido para la proteína E2_{TM}E1 (95%) se alcanza a una concentración de proteína de 0.6 μ M, al igual que con E2E1. Esta concentración de proteína es la mitad que la necesaria en el caso de E2 y sus mutantes de fusión para alcanzar el valor máximo de liberación del contenido acuoso de las vesículas, siendo además menor dicho valor (70%). Por tanto, el ectodominio de E1 puede intervenir en este proceso, ayudando a E2 a provocar la ruptura de las vesículas y potenciando su efecto. La delección de los péptidos de fusión de E2 no afecta a la capacidad de la proteína de producir liberación del contenido interno de las vesículas de PG a pH 5.0.

En cuanto a la cinética del proceso, se observa que la velocidad de liberación es idéntica a la de E2E1.

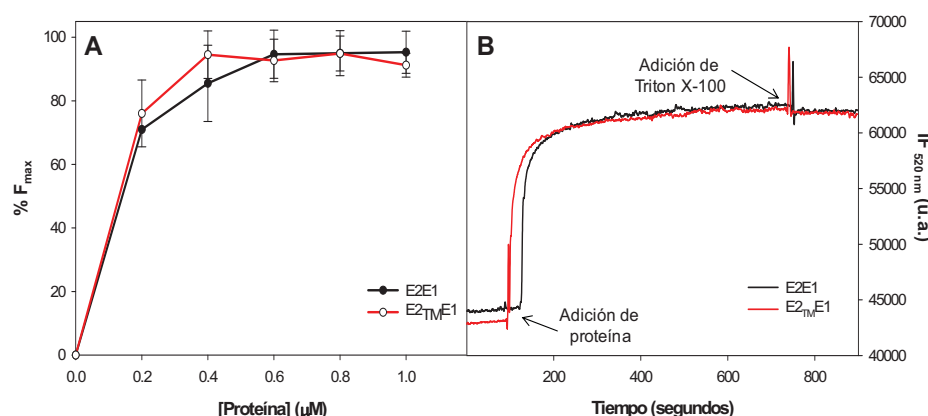


Figura 43. Liberación del contenido interno de vesículas de PG inducida por la adición de E2E1 y E2_{TM}E1 a pH 5.0. A las vesículas de PG, en las que se han coencapsulado el fluoróforo ANTS y su desactivador colisional DPX, se les añade la proteína a la concentración deseada y se registra el aumento de fluorescencia a 520 nm debida al ANTS, a 37 °C con agitación constante. El valor de 100% de liberación se obtiene mediante adición de Triton X-100 al 0.5%, siendo el valor de 0% el obtenido al añadir tampón. A) Porcentaje de liberación de contenidos acuosos en función de la concentración de proteína añadida. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en, al menos, dos experimentos independientes. B) Cinéticas de liberación de contenidos acuosos a una concentración de proteína de 0.6 μ M.

5.1.3.4.4. Polarización de fluorescencia

El efecto termotrópico de E2_{TM}E1 sobre las curvas de transición de fase de vesículas de DMPG marcadas con DPH y con TMA-DPH a pH 5.0, se muestra en la Figura 44. Para ambas sondas, se observa una disminución de la amplitud de la transición de fase del lípido, efecto que es más acusado a temperaturas por encima de la T_m, lo que significa que la proteína afecta principalmente a las cadenas de acilo que se encuentran en el estado líquido cristalino, induciendo un mayor orden en el empaquetamiento de estas cadenas. También se observa un sensible aumento en la temperatura de transición de fase (unos 2 °C) (Tabla 9). Este comportamiento es muy similar al observado en el caso de E2_{TM} y E2.

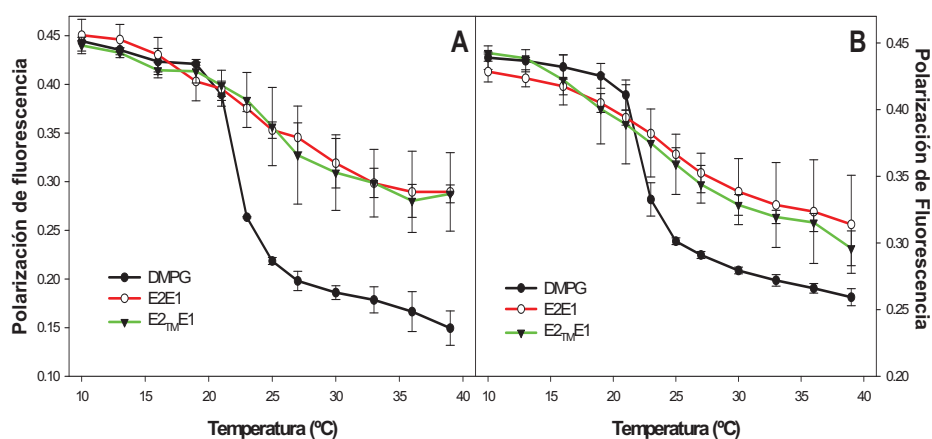


Figura 44. Curvas de transición de fase de vesículas de DMPG marcadas con DPH (A) o con TMA-DPH (B) en presencia de E2E1 y E2_{TM}E1. La relación sonda:fosfolípido empleada fue 1:500 en el caso del DPH y 1:100 en el caso de TMA-DPH. Las vesículas de fosfolípidos (0.14 mM) se incuban con la proteína durante 30 min a 37 °C en *Medium buffer* a pH 5.0. A continuación se mide la polarización de fluorescencia a cada temperatura. La relación proteína lípido empleada ha sido 1:50. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

PROTEÍNA	T _m DMPG-DPH (°C)	T _m DMPG-TMA-DPH (°C)
sin proteína	22.5	22.7
E2E1	24.7	25.0
E2 _{TM} E1	25.0	24.3

Tabla 9. Temperaturas de transición de fase de DMPG marcadas con DPH y TMA-DPH a pH 5.0 en presencia de E2E1 y E2_{TM}E1.

5.2. IMPLICACIÓN DE LA CYS 652 EN EL ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN

DE E2₆₆₁

La purificación del ectodominio de E2₆₆₁ en células de insecto mediante su infección por baculovirus recombinantes da lugar a la obtención de una proteína constituida por distintas formas oligoméricas unidas al menos por puentes disulfuro (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009). Basándonos en trabajos recientes en los que se ha estudiado la conectividad entre las 18 Cys de la proteína E2 (Krey *et al.*, 2010; Whidby *et al.*, 2009), se ha conseguido determinar la existencia de un posible enlace disulfuro entre las Cys 652 y 677. En el caso de E2₆₆₁, la proteína está truncada en el residuo 661, y por tanto la Cys 677 no está presente en ella, lo que deja una Cys libre que podría formar puentes disulfuro intermoleculares.

Con el objetivo de conseguir una proteína con una menor tendencia a agregar y comprobar si la presencia de estos agregados podría afectar a la función de la proteína, se ha diseñado un mutante en el que la Cys 652 ha sido sustituida por una Ser para conservar algunas de las propiedades bioquímicas en esta posición.

5.2.1. CLONACIÓN

Al igual que con los mutantes de fusión, la clonación del ADN codificante del mutante E2_{C652S} se realiza en el vector pAcGP67-A con el fin de expresarlo posteriormente en el sistema de baculovirus. A partir del plásmido pAcGP67-A-E2₆₆₁, se realizaron reacciones de PCR a ambos lados de la mutación para incorporar tanto la mutación C652S como un sitio de corte por la enzima *Bsp*119I (Figura 45).

Los oligonucleótidos empleados para la introducción de la mutación han sido los siguientes:

E2C652S (+): 5'-C CGT T_{cg} AAT CTG GAA GAC AGG GAC-3'

E2C652S (-): 5'-GC ATT cgA ACG CTC GCC CCG CGT CCA-3'

En mayúscula aparecen las bases que hibridan con la secuencia correspondiente del ADN del molde, las subrayadas representan el sitio de restricción *Bsp119I* y las resaltadas en rojo corresponden a la mutación que se va a introducir. Para los extremos 5' y 3' de la construcción se han empleado los oligonucleótidos Gp67 (+) y Gp67 (-).

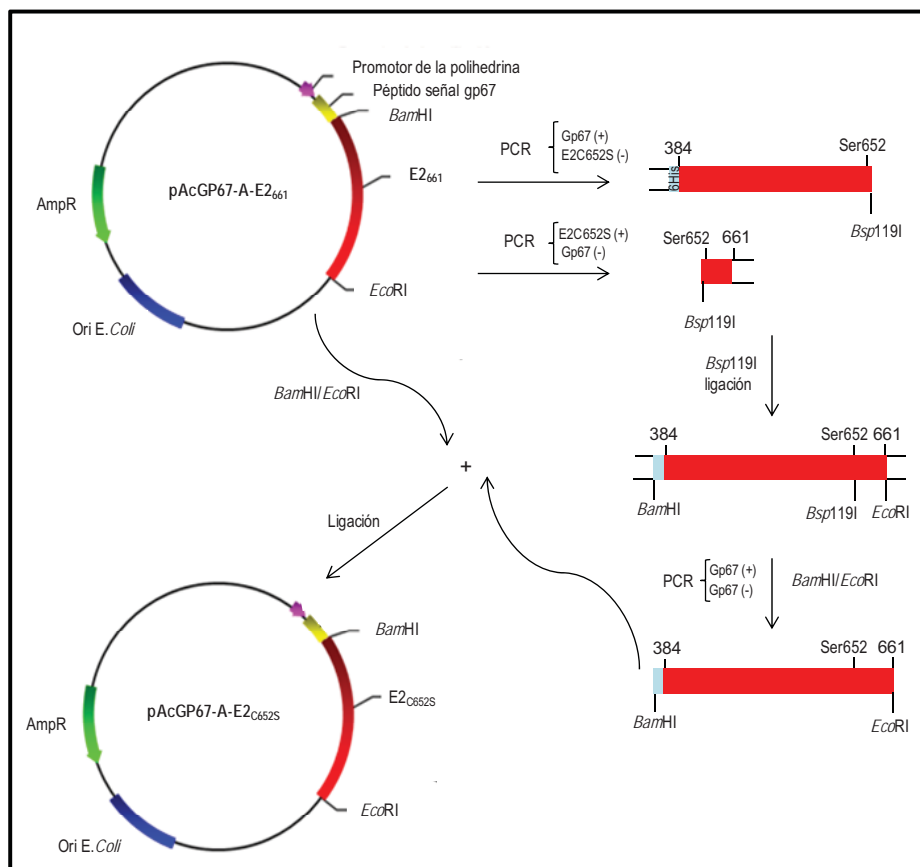


Figura 45. Esquema de clonación de E2C652S en pAcGP67-A. Los dos fragmentos amplificados por PCR con Gp67 (+)-E2C652S (-) y Gp67 (-)-E2C652s (+), usando como molde el plásmido pAcGP67-A-E2₆₆₁, son digeridos con la enzima *Bsp*119I, para ser posteriormente ligados entre sí y amplificados por PCR. El fragmento de PCR obtenido se digiere con *Bam*HI/*Eco*RI, y se liga en el vector digerido con las mismas enzimas.

5.2.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN

La obtención de baculovirus recombinantes, así como su purificación y amplificación se ha realizado como se describe en el apartado 4.3.2.1 de Materiales y Métodos. La expresión de la proteína recombinante en el sedimento y en el sobrenadante de las células Tni infectadas con los baculovirus recombinantes se comprobó mediante inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-6His, siendo la mayor parte de la proteína secretada al medio extracelular (Figura 46A). Tras monitorizar la expresión de la proteína en el sobrenadante a diferentes tiempos de infección (1, 2, 3, 4, y 5 días), se pudo comprobar que al igual que en el resto de proteínas clonadas anteriormente, la expresión de la proteína recombinante es óptima a los 5 días (Figura 46B).

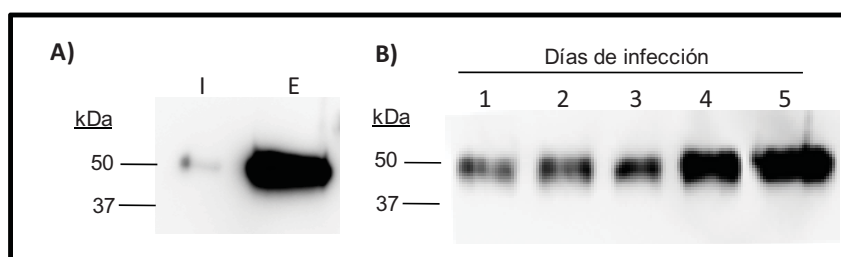


Figura 46. Expresión de E2_{C652S} en células de insecto Tni. A) Expresión intracelular (I) y expresión en el sobrenadante o extracelular (E) tras 5 días de infección. B) Expresión en función de los días de infección. La detección se ha realizado con un anticuerpo monoclonal anti-6His.

La purificación de la proteína a partir del medio extracelular de las células Tni mediante una columna de Ni-NTA-agarosa permite obtener una proteína con un elevado grado de pureza, como se observa en la Figura 47A. Prácticamente la totalidad de la proteína es retenida en la columna y tras la elución con Imidazol 200 mM se llegan a obtener unos 12 mg de proteína por litro de cultivo. Una vez purificada, la proteína se dializa frente a un tampón adecuado.

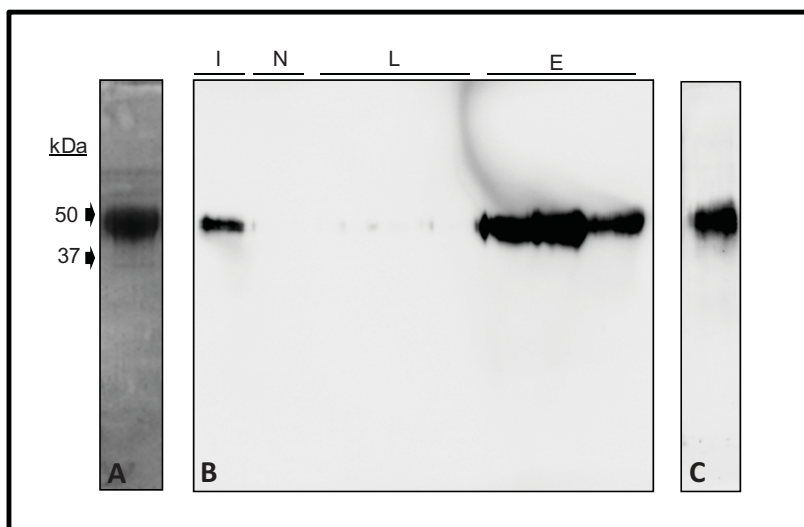


Figura 47. Purificación de E2_{C652S}. Panel A) Tinción con azul de Coomassie de la proteína purificada. Panel B) inmunodetección con anti-6His de la proteína purificada. I: medio inicial; N: no retenido; L: lavados con tampón con imidazol 10 y 20 mM; E: elución con tampón con imidazol 200 mM. Panel C) Inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti E2 de conejo de la proteína purificada y dializada.

Al igual que se ha observado con E2₆₆₁ y el resto de los mutantes de fusión obtenidos en el apartado 5.1 de Resultados, la masa molecular experimental de la proteína es unos 15 kDa mayor que la teórica calculada a partir de la secuencia de aminoácidos debido a que la proteína se encuentra altamente glicosilada.

La composición de aminoácidos obtenida a partir del análisis de aminoácidos de la proteína purificada coincide con la composición teórica deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de su ADN codificante. A partir de los datos obtenidos en el análisis de aminoácidos se calculó el coeficiente de extinción experimental ($E^{0.1\%} = 2.4$) que resultó ser muy similar al teórico ($E^{0.1\%} = 2.3$) calculado a partir de la secuencia de aminoácidos (Protparam).

5.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN

Una vez obtenida la proteína se procedió a comprobar si la sustitución de la Cys libre 652 por una Ser en el ectodominio de E2 provoca una variación en su estado de oligomerización. Para ello, se realizaron varios estudios.

En primer lugar, se aplicaron las proteínas E2₆₆₁ y E2_{C652S} en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), en presencia o ausencia del agente reductor β -mercaptoetanol (Figura 48). De esta forma se observó que la proteína E2_{C652S} migra en forma monomérica en condiciones desnaturalizantes y reductoras, mientras que cuando se preservan los puentes disulfuro, continúa migrando en forma de cuatro bandas que corresponden a las formas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica, como ocurre con E2₆₆₁, aunque existe un porcentaje de monómero muy superior con respecto al que presenta E2₆₆₁.

Este resultado indica que la Cys 652 parece estar implicada en la formación de un puente disulfuro intermolecular, que da lugar a una mayor agregación de la proteína, aunque sigue existiendo un porcentaje importante de proteína en forma de oligómeros.

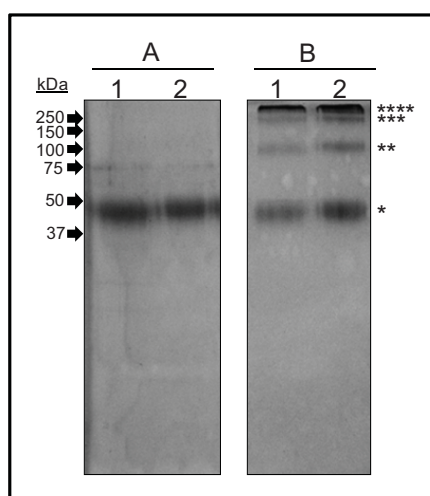


Figura 48. PAGE-SDS al 15% de la proteína E2₆₆₁ y E2_{C652S} en (A) presencia de SDS 1% (p/v) y β -mercaptoetanol 5% (v/v) y (B) en condiciones no reductoras. (1) E2₆₆₁, (2) E2_{C652S}. (*) Monómero; (**) Dímero; (***) Trímero; (****) Tetramero.

A continuación, se realizaron estudios de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica con el fin de poder cuantificar las diferencias observadas en el estado de agregación de E2_{C652S} con respecto a E2₆₆₁. Teniendo en cuenta que a pH ácido se producen variaciones en la estructura cuaternaria de la proteína E2₆₆₁ (Rodríguez, M., Tesis Doctoral, 2007), estos

experimentos se han llevado a cabo tanto a pH 7.0 como a 5.0 en condiciones nativas (Figura 49).

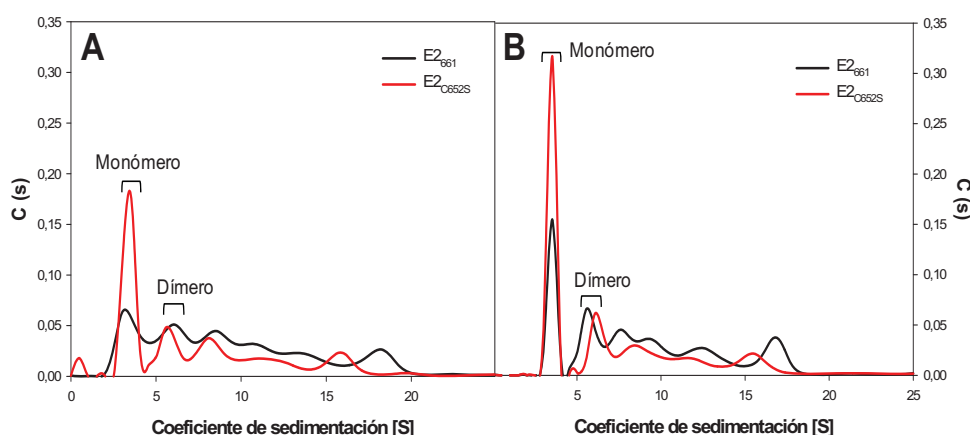


Figura 49. Distribución del coeficiente de sedimentación de E2₆₆₁ y E2_{C652S} calculado a partir de los experimentos de velocidad de sedimentación a pH 7.0 (A) y pH 5.0 (B) en condiciones nativas. Los ensayos se realizaron en tampón Mops 30mM pH 7.0 o 5.0, NaCl 100 mM, a 20 °C, 48 krpm, y a una concentración de proteína de 0.1 mg/ml.

Así, se observó que, a pH 7.0, la forma mayoritaria de E2_{C652S} es el monómero (39%) (Tabla 10) con un coeficiente de sedimentación de 3.5 S, mientras que la proporción de monómero en E2₆₆₁ al mismo pH es del 23% con un coeficiente de sedimentación de 3.6 S. Cabe mencionar que el porcentaje de monómero en la proteína E2₆₆₁ varía desde el 0 al 23%, según la muestra empleada, manteniéndose constante la proporción de dímero. La proporción de dímero es algo superior para E2₆₆₁, siendo éste la forma mayoritaria. A pH 5.0, la proporción de la forma monomérica aumenta hasta el 43% en la proteína E2_{C652S}, mientras que se mantiene inalterada para E2₆₆₁. Ambas proteínas presentan tendencia a la autoasociación formando agregados de mayor masa molecular, siendo menor la polidispersidad presente en el caso del mutante E2_{C652S}, debida a la presencia de un porcentaje de monómero que supone prácticamente el doble del obtenido con E2₆₆₁ para ambos valores de pH (Figura 49).

Proteína	pH	% Monómero	% Dímero	% Otros agregados
E2 ₆₆₁	7.0	23	26	51
	5.0	23	19	58
E2 _{C652S}	7.0	39	19	42
	5.0	43	19	38

Tabla 10. Porcentajes de cada una de las formas oligoméricas que presentan E2₆₆₁ y E2_{C652S} a pH 7.0 y 5.0. Estos porcentajes han sido obtenidos a partir de las áreas de los picos obtenidos en la Figura 49.

5.2.4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

5.2.4.1. Caracterización espectroscópica

Se ha realizado la caracterización espectroscópica de la proteína E2_{C652S} mediante dicroísmo circular, en el ultravioleta próximo y en el lejano, así como mediante espectroscopía de emisión de fluorescencia, con el objetivo de comprobar si la estructura de la proteína se ha modificado al mutar la Cys 652.

A) Espectros de dicroísmo circular

Al realizar los espectros de dicroísmo circular de E2₆₆₁ y E2_{C652S} en el UV lejano, se observa que ambas proteínas presentan un mínimo en torno a 205 nm, con una elipticidad molar por residuo de $-5400 \text{ grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, indicativo de la existencia de un porcentaje relativamente alto de estructura aperiódica (Figura 50A). Empleando el método CCA se han calculado los porcentajes de estructura secundaria experimentales a partir de los espectros mostrados (Tabla 11). Al igual que E2₆₆₁, la proteína mutante E2_{C652S} presenta un alto porcentaje de estructura β y el contenido en hélice α es muy bajo. Los datos obtenidos demuestran que no se han producido variaciones en la estructura secundaria de E2₆₆₁ al sustituir la Cys 652 por una Ser.

En los espectros de dicroísmo circular en el UV próximo, se observan dos bandas dicroicas negativas en torno a 270 y 300 nm. Dichas bandas ponen de manifiesto que E2_{C652S} al igual que E2₆₆₁, presenta una estructura tridimensional capaz de suministrar un entorno asimétrico a los cromóforos y se puede considerar, por lo tanto, como una proteína con una estructura no desnaturalizada, no apreciándose cambios en la conformación del mutante con respecto a E2₆₆₁.

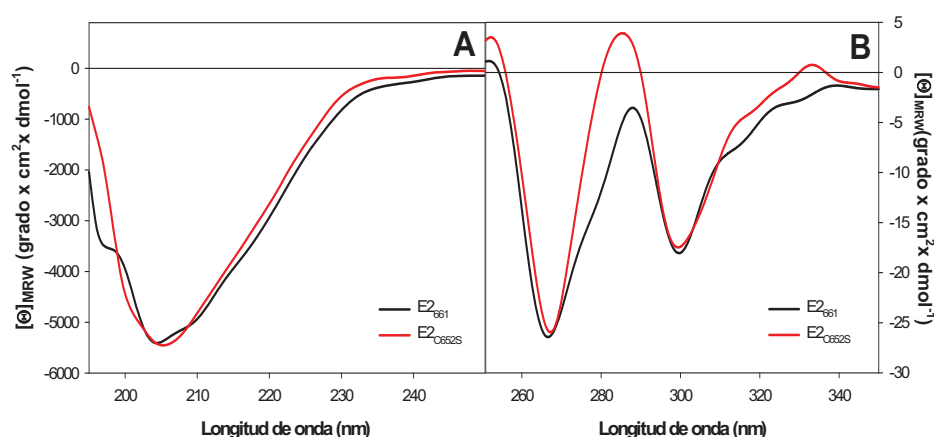


Figura 50. Espectros de dicroísmo circular de E2_{C652S} en comparación con E2₆₆₁, en el UV-lejano (A) y en el UV-próximo (B). Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM a temperatura ambiente. La concentración de proteína empleada es 0.15 mg/ml y paso óptico de 0.1 cm (A) y 0.5 mg/ml y paso óptico de 0.5 cm (B). Ambos espectros son el resultado de 5 acumulaciones y han sido corregidos frente a las contribuciones del tampón.

B) Espectros de emisión de fluorescencia

El espectro de emisión de fluorescencia de la proteína E2_{C652S} presenta un máximo en torno a los 335 nm, al excitar las moléculas a las longitudes de onda de 275 nm y 295 nm (Figura 51). Esto indica que los Trp de la proteína se encuentran en un microentorno relativamente poco hidrofóbico. Además, la contribución de los residuos de tirosina es muy baja. Por tanto, el microentorno en el que se encuentran los fluoróforos de la proteína no ha variado al introducir la mutación, ya que los espectros de ambas proteínas son muy similares.

% Estructura secundaria	E2 ₆₆₁		E2 _{C652S}	
	E	T	E	T
Hélice α	5	2	5	2
Estructura β	53	34	54	34
No ordenada	42	64	41	64

Tabla 11. Porcentajes de estructura secundaria de E2_{C652S} en comparación con E2₆₆₁. Los porcentajes de estructura secundaria experimentales (E) fueron obtenidos aplicando el método CCA (Perczel *et al.*, 1991) a los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, mientras que los teóricos (T) se obtuvieron mediante el método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) para tres componentes.

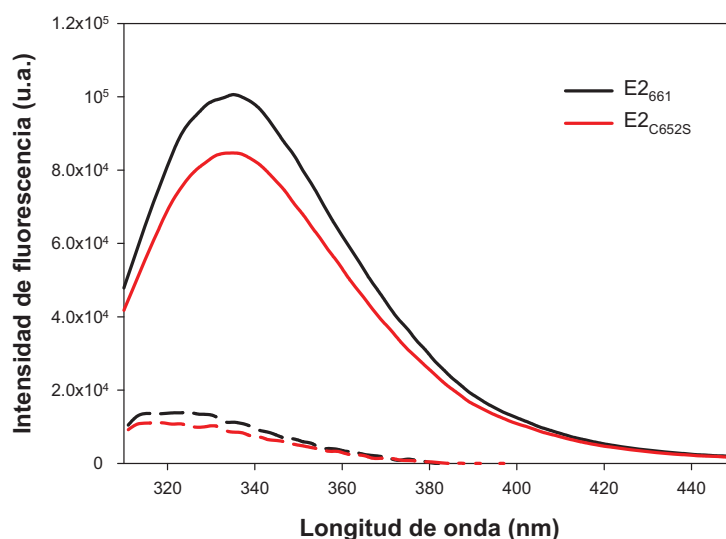


Figura 51. Espectros de emisión de fluorescencia de E2₆₆₁ y E2_{C652S}. Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM a una concentración de 0.05 mg/ml. Se muestran los espectros obtenidos al excitar con una longitud de onda de 275 nm (—), y la contribución de las tirosinas (---), calculada según se describe en el apartado 4.13.1 de Materiales y Métodos.

5.2.5. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA

Con la finalidad de comprobar si la presencia de una mayor proporción de monómero en la proteína E2_{C652S} afecta a la capacidad antigénica de la proteína, se ha realizado un enzoinmunoensayo utilizando una batería de sueros de

pacientes infectados por el HCV, así como de pacientes negativos frente al virus. Como se muestra en la Figura 52, la proteína E2_{C652S} es reconocida por los anticuerpos presentes en 6 de los 8 sueros positivos empleados, al igual que E2₆₆₁, no observándose variaciones en su capacidad antigénica, lo que indica que la presencia de agregados en E2₆₆₁ no afecta a sus propiedades inmunogénicas.

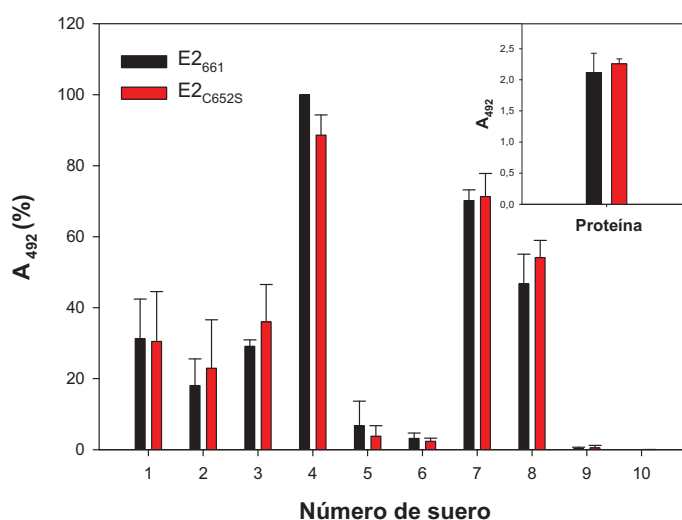


Figura 52. ELISA con los sueros de pacientes infectados por el HCV (sueros 1 a 8) y de pacientes sanos (sueros 9 y 10) para la detección de E2₆₆₁ y E2_{C652S}. El ensayo se realizó tapizando las placas con 0.1 µg de proteína/pocillo y con los sueros diluidos 1:100-1:500. Se ensayaron un total de 8 sueros negativos y todos proporcionaron la misma absorbancia que los sueros 9 y 10. Recuadro interior: ELISA con H53. Este ensayo se ha realizado tal y como se indica en el apartado 4.8.2 de Materiales y Métodos. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Tras realizar un enzimoimmunoensayo empleando el anticuerpo conformacional H53, se volvió a comprobar que la conformación de la proteína no varía (Figura 52, recuadro interior).

5.2.6. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA EN PRESENCIA DE LÍPIDOS: ESPECTROS FTIR-ATR

Se han registrado los espectros FTIR en modo ATR de E2_{C652S} en ausencia y en presencia de vesículas de DMPG tanto a pH 7.0 como a pH 5.0 para comprobar si se producen cambios en la estructura de la proteína al interaccionar con los lípidos y si estos cambios son distintos a los observados con E2₆₆₁ en el apartado 5.1.1.4.

Al calcular la diferencia entre el espectro realizado en presencia de vesículas de DMPG con respecto al espectro de proteína pura a ambos valores de pH (Figura 53) se observan los mismo resultados que se obtuvieron con E2₆₆₁; es decir, a pH 7.0 se obtiene una banda ancha y negativa que ocupa casi toda la región de la banda amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) y a pH 5.0 se obtiene un pico más estrecho y centrado en torno a los 1655 cm^{-1} , lo que es indicativo de una estructura en hélice α . El porcentaje del área del pico obtenido en el espectro de diferencia con respecto al área de la banda amida I obtenida en el espectro de proteína pura representa alrededor de un 10%. Estos datos vuelven a indicar que en presencia de vesículas de DMPG a pH 5.0 hay un segmento de unos 30 aminoácidos que adopta una estructura en hélice α en la proteína E2_{C652S}.

Mediante el método de autodeconvolución de Fourier a partir de la banda amida I se han calculado de los porcentajes de estructura secundaria de las proteínas en presencia y en ausencia de vesículas de DMPG (Tabla 12). Al comparar los datos obtenidos en ausencia y en presencia de lípidos, se observa un aumento en el contenido en hélice α para ambos valores de pH, lo que no se corresponde con los datos obtenidos en los espectros de diferencia anteriores en los que sólo se observa este efecto a pH 5.0, al igual que se observó con E2₆₆₁. Estas discrepancias reflejan las limitaciones de esta técnica para asignar los porcentajes de estructura secundaria.

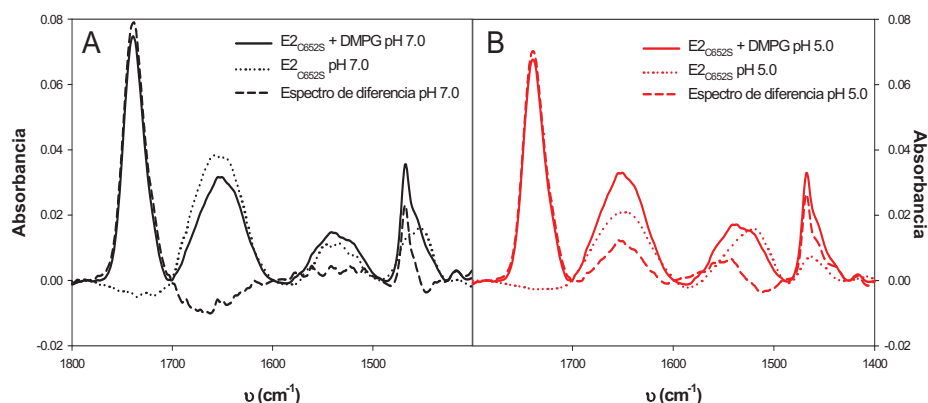


Figura 53. Espectros FTIR-ATR de E2_{C652S} en presencia y en ausencia de vesículas de DMPG, y su diferencia a pH 7.0 (A) y pH 5.0 (B). En los espectros de proteína pura el tampón empleado ha sido Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM y fosfato sódico 66 mM, pH 5.0. Se han realizado los espectros con 12 μ g de proteína. En los espectros en presencia de vesículas de DMPG el tampón empleado fue Tris 5 mM, Mes 5 mM, Acetato sódico 5 mM, NaCl 0.1 M a pH 7.0 o 5.0. Se han realizado los espectros con 100 μ g de lípido y 12 μ g de proteína, previamente incubados 30 min a 37 °C. En ambos casos la proteína no unida se ha eliminado mediante un lavado con agua. Los espectros de diferencia (— — —) se han obtenido tras restar los espectros en presencia y ausencia de lípidos a ambos valores de pH.

DMPG	pH	% Estructura secundaria				$\alpha 1$	$\alpha 2$
		Hélice α	Estructura β	No ordenada	Giro β		
—	7.0	20	44	10	26	-	-
	5.0	19	43	11	27	-	-
+	7.0	30	21	14	35	25°	10°
	5.0	33	25	9	33	15-20°	0°

Tabla 12. Datos obtenidos a partir de los espectros de FTIR-ATR de E2_{C652S} a pH 7.0 y 5.0, en ausencia y en presencia de vesículas de DMPG. Se muestran los porcentajes de estructura secundaria calculados a partir de la banda amida I y los ángulos de orientación de las proteínas en la membrana calculados tal y como se describe en el apartado 4.14.3 de Materiales y Métodos. $\alpha 1$: ángulo de orientación de la proteína en la membrana; $\alpha 2$: ángulo de orientación de la hélice α en la membrana.

Los valores obtenidos de los ángulos de orientación de la proteína en la membrana lipídica (Tabla 12), indican que la proteína está integrada en la membrana tanto a pH 7.0 como a pH 5.0, observándose una pequeña variación en el ángulo ($5-10^\circ$) a pH 5.0. Este mismo resultado se observa en el caso del ángulo de orientación de la hélice α en la membrana. Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos con E2₆₆₁.

5.2.7. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: ESTUDIOS DE INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA

A continuación se procedió a comprobar si la presencia de una mayor cantidad de monómero en el caso del mutante E2_{C652S} influye en su capacidad para inducir desestabilización de vesículas de fosfolípidos ácidos (PG) a pH 5.0.

5.2.7.1. Ensayo de agregación

La proteína E2_{C652S} es capaz de inducir agregación de vesículas de PG a pH 5.0 (Figura 54). Al igual que con E2₆₆₁, a partir de una concentración de proteína de 0.5 μM , se puede apreciar la agregación de las vesículas, aunque la capacidad de esta proteína para inducir agregación es algo menor que la de E2₆₆₁. A una concentración de proteína de 3.5 μM , E2_{C652S} induce un 25% menos de agregación en comparación con E2₆₆₁.

Este efecto podría estar causado por la menor polidispersidad observada para el mutante. Es decir, la presencia de oligómeros podría aumentar la capacidad de la proteína para inducir agregación de vesículas.

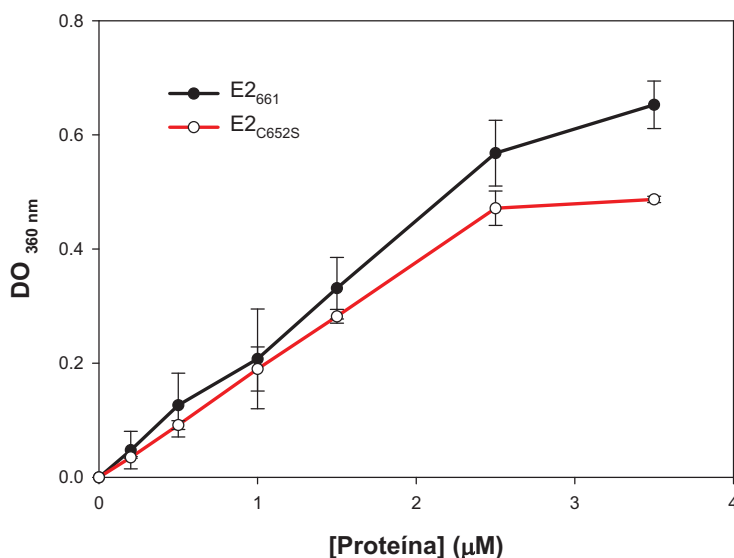


Figura 54. Variación de la densidad óptica a 360 nm inducida por la agregación de vesículas de PG al interactuar con E2₆₆₁ y E2_{C652S}. El tampón empleado fue *Medium Buffer* a pH 5.0. Los valores de la densidad óptica a 360 nm han sido medidos tras incubarse 15 min a 37 °C la preparación de vesículas, a una concentración 0.14 mM, con diferentes concentraciones de proteína. El valor que se representa es la diferencia entre el valor alcanzado en cada caso y el de un blanco que sólo contiene fosfolípidos. Se muestra la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes.

5.2.7.2. Mezcla de lípidos

Como se observa en la Figura 55, el mutante E2_{C652S} es capaz de inducir mezcla de lípidos en vesículas de PG a pH ácido. Los resultados obtenidos muestran que tanto E2₆₆₁ como E2_{C652S} producen una disminución del %RET desde el 70% en ausencia de proteína, hasta un 10% para una concentración final de proteína de 3.5 μM. Estos valores corresponden a una dilución de la densidad superficial de aceptor de unas 10 veces, lo que indica que se ha producido la fusión completa de las vesículas. Por lo tanto, la presencia del doble de cantidad de monómero en la proteína E2_{C652S}, no afecta a su capacidad para inducir mezcla de lípidos en las condiciones ensayadas.

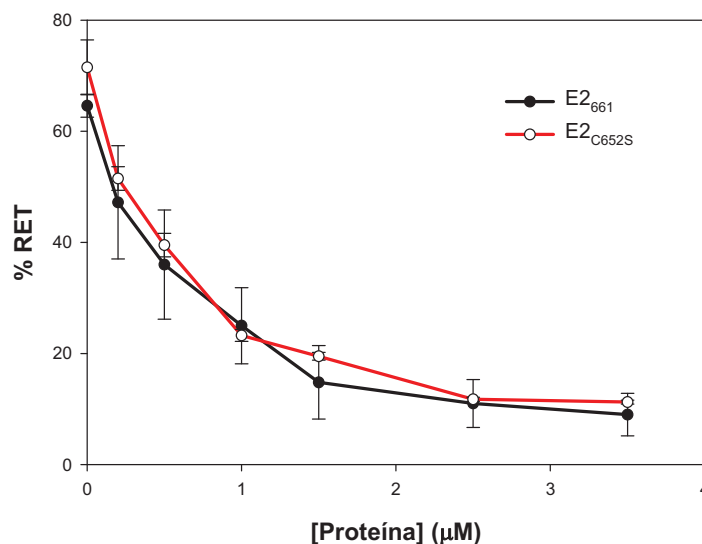


Figura 55. Mezcla de lípidos en vesículas de PG inducida por la interacción de E2₆₆₁ y E2_{C652S} a pH 5.0. La proteína se añade a una mezcla 1:9 de vesículas marcadas (NBD-PE (1%), Rh-PE (0.8%)): vesículas sin marcar. La concentración final de fosfolípido fue 0.14 mM. El %RET se calcula a partir de las intensidades de fluorescencia medidas a 530 y 590 nm de la curva de calibrado. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en al menos dos experimentos independientes.

5.2.7.3. Liberación de contenidos acuosos

En la Figura 56 puede observarse que E2_{C652S} es capaz de permeabilizar vesículas de PG a pH 5.0 del mismo modo que E2₆₆₁, obteniéndose un valor de fluorescencia máximo (F_{\max}) del 75% para ambas proteínas que se alcanza a 1.2 μM. Por lo tanto, el efecto de las proteínas es mayor que en el caso de los ensayos de agregación y mezcla de lípidos. En cuanto a la cinética del proceso de liberación del contenido acuoso de las vesículas, se observa que la velocidad de liberación es muy similar a la de E2₆₆₁. Es decir, la presencia del doble de cantidad de monómero en la proteína E2_{C652S} no parece afectar a su capacidad para inducir liberación del contenido interno de las vesículas de PG a pH 5.0.

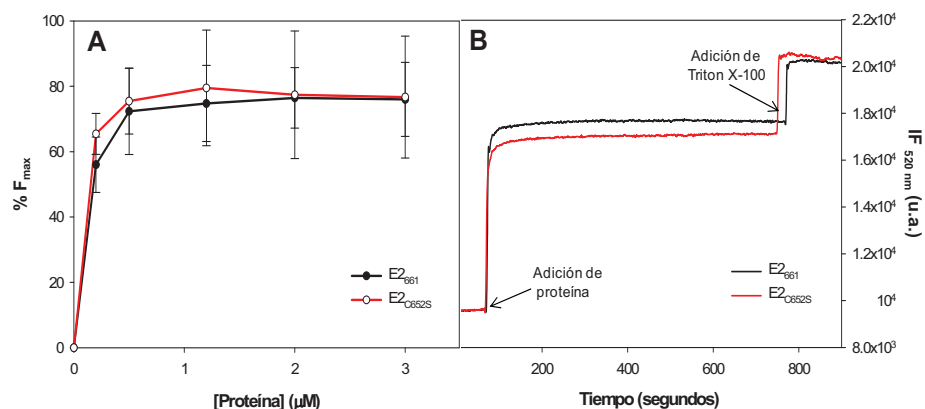


Figura 56. Liberación del contenido interno de vesículas de PG inducida por la adición de $E2_{661}$ y $E2_{C652S}$ a pH 5.0. A las vesículas de PG, en las que se han coencapsulado el fluoróforo ANTS y su desactivador colisional DPX, se les añade la proteína a la concentración deseada y se registra el aumento de fluorescencia a 520 nm debida al ANTS, a 37 °C con agitación constante. El valor de 100% de liberación se obtiene mediante adición de Triton X-100 al 0.5%, siendo el valor de 0% el obtenido al añadir tampón. A) Porcentaje de liberación de contenidos acuosos en función de la concentración de proteína añadida. Se muestran los valores medios obtenidos en dos experimentos independientes. B) Cinéticas de liberación de contenidos acuosos a una concentración de proteína de 2.0 μM .

5.2.7.4. Polarización de fluorescencia

Los estudios de polarización de fluorescencia se han realizado utilizando las sondas fluorescentes DPH y TMA-DPH.

La proteína $E2_{C652S}$ interacciona con vesículas de DMPG a pH 5.0, afectando al comportamiento termotrópico del lípido. El resultado obtenido con ambas sondas es muy similar, observándose una disminución de la amplitud de la transición de fase de los lípidos (Figura 57). El efecto es más acusado a temperaturas por encima de la T_m , lo que significa que la proteína afecta principalmente a las cadenas de acilo que se encuentran en el estado líquido cristalino, induciendo un mayor orden en el empaquetamiento de estas cadenas, lo que da lugar a un considerable aumento en el valor de la polarización de fluorescencia. También se observa un sensible aumento en la temperatura de transición de fase, de unos 2 °C con respecto al lípido solo y con ambas sondas (Tabla 13). El comportamiento de ambas proteínas es muy similar, lo que

demuestra una vez más que la presencia de agregados en E2₆₆₁ no afecta a su capacidad para interaccionar y desestabilizar vesículas lipídicas.

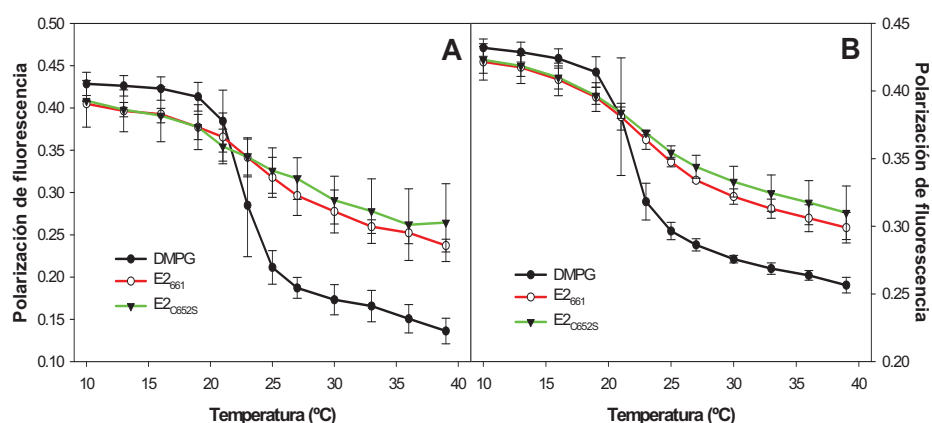


Figura 57. Curvas de transición de fase de vesículas de DMPG marcadas con DPH (A) o con TMA-DPH (B) en presencia de E2₆₆₁ y E2_{C652S}. La relación sonda:fosfolípido empleada fue 1:500 en el caso del DPH y 1:100 en el caso de TMA-DPH. Las vesículas de fosfolípidos (0.14 mM) se incuban con la proteína durante 30 min a 37°C en *Medium buffer* 5.0. A continuación se mide la polarización de fluorescencia a cada temperatura. La relación proteína:lípido empleada ha sido 1:50. Se muestran los valores medios obtenidos en dos experimentos independientes.

PROTEÍNA	Tm DMPG-DPH (°C)	Tm DMPG-TMA-DPH (°C)
Sin proteína	23.0	22.1
E2 ₆₆₁	25.3	23.8
E2 _{C652S}	25.2	23.8

Tabla 13. Temperaturas de transición de fase de DMPG marcadas con DPH y TMA-DPH a pH 5.0 en presencia de E2₆₆₁ y E2_{C652S}.

5.3. EFECTO DE E1 EN EL PLEGAMIENTO DE E2

Las glicoproteínas E1 y E2 del HCV han sido clasificadas como proteínas de fusión tipo II. Una de las características de este tipo de proteínas es que se pliegan como un heterodímero con la glicoproteína que la precede en la poliproteína precursora. La primera proteína en el tándem (E1) actuaría como chaperona para el plegamiento de la segunda, que es la que actuaría como proteína de fusión (E2). La función chaperona ha sido demostrada experimentalmente para las glicoproteínas prM de Flavivirus (Lorenz *et al.*, 2002) y p62 de alfavirus (Andersson *et al.*, 1997), que preceden a las proteínas de fusión E y E1, respectivamente, en la poliproteína precursora. Además este efecto parece ser recíproco, ya que p62 y prM adoptan su estructura nativa únicamente en presencia de su respectiva proteína de fusión.

Partiendo de estas premisas, se diseñó una proteína quimérica basada en la glicoproteína E1 completa con su región transmembrana seguida del ectodominio de E2 (construcción llamada E1tmbE2, Figura 58) para ser expresada en cultivos de células de insecto Tni. La finalidad de esta construcción fue lograr la secreción de la proteína E2₆₆₁ al medio de cultivo, tras su plegamiento en presencia de E1 y posterior procesamiento proteolítico. El ectodominio de E2 procesado ha sido purificado y caracterizado para compararlo con la proteína E2₆₆₁. En este sentido, un estudio similar fue llevado a cabo en células S2 de *Drosófila* obteniéndose la proteína E2 en el sobrenadante correctamente procesada y con la capacidad para inhibir la infección por HCVcc (Krey *et al.*, 2010).

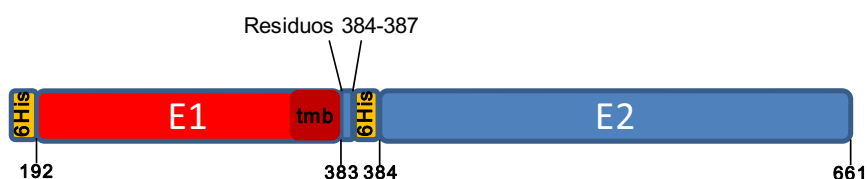
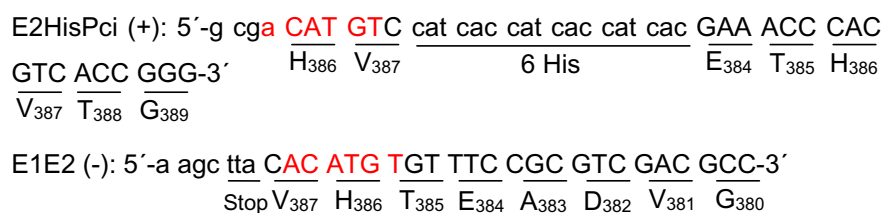


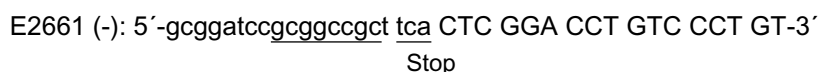
Figura 58. Representación esquemática de la construcción E1tmbE2. La proteína presenta una secuencia de 6 His en el extremo amino terminal de E1 y de E2. La secuencia de E1 está completa, incluyendo la región transmembrana (tmb), mientras que la secuencia de E2 está truncada en el aminoácido 661, es decir, sólo incluye el ectodominio. Se han incluido los 4 primeros aminoácidos de E2 antes de la extensión de 6 His de E2 con el fin de asegurar el correcto procesamiento de la proteína por las proteasas celulares tras el residuo 383 de E1.

El molde empleado para realizar la construcción E1tmbE2 ha sido el plásmido pAcGP67-A-E1E2₇₄₆, que comprende la secuencia de E1 completa (residuos 192-383) y la secuencia de E2 hasta el aminoácido 746 (residuos 384-746) (construcción realizada por el Dr. Tello Pernas). Este plásmido presenta una secuencia de 6 His en el extremo amino terminal de E1, pero no lleva secuencia de 6 His en E2, por lo que es necesario introducirla para facilitar la purificación de E2 una vez sea procesada y secretada al medio extracelular. La introducción de las 6 His se decidió realizarla en el extremo amino terminal de E2, con el objetivo de disponer de una proteína lo más parecida posible a la proteína E2₆₆₁ producida en ausencia de E1. Con este fin se han diseñado los siguientes oligonucleótidos:



En mayúscula aparecen las bases que hibridan con la secuencia correspondiente del ADN del molde, las resaltadas en rojo representan el sitio de restricción *Pci*I. Con estos dos oligonucleótidos se pretende introducir las 6 His tras los 4 primeros aminoácidos de E2 (residuos 384 a 387). Tras las 6 His empieza nuevamente la secuencia de E2 desde el aminoácido 384.

Para los extremos 5' y 3' de la construcción se han empleado los oligonucleótidos Gp67 (+) y E2661 (-).



En mayúscula aparecen las bases que hibridan con el ADN molde; la secuencia del sitio de restricción *NotI* aparece subrayada.

La clonación de la construcción E1tmbE2 en el plásmido pAcGP67-A se ha realizado tal y como se describe en el esquema de la Figura 59.

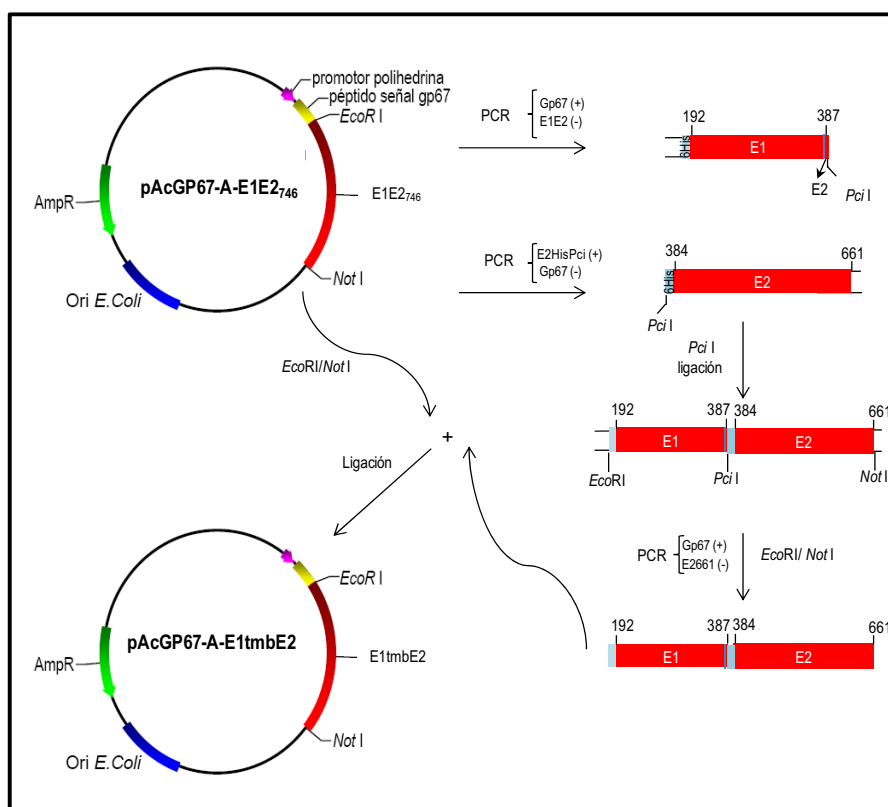


Figura 59. Esquema de clonación de E1tmbE2 en el plásmido pAcGP67-A. Tomando como molde el pAcGP67-A-E1E2₇₄₆ se amplifican dos fragmentos por PCR: el 5' (E1), con los oligonucleótidos Gp67 (+) y E1E2 (-), y el 3' (E2), con E2HisPci (+) y E2661 (-). Los fragmentos se digirieron con PciI, se ligaron, y el producto de ligación se amplificó con los oligonucleótidos extremos Gp67 (+) y E2661 (-) para obtener el ADN codificante de E1tmbE2. Este ADN codificante se digirió con EcoRI/NotI, y se ligó en el vector pAcGP67-A digerido con las mismas enzimas.

5.3.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN

Se llevó a cabo la cotransfección de células Sf9 con el plásmido recombinante, tal y como se ha descrito en el apartado 4.3.2.1 de Materiales y Métodos. Una vez obtenidos los baculovirus recombinantes, se procedió a su purificación y amplificación en células Tni. De ahora en adelante se va a nombrar

a la proteína E2 plegada en presencia de E1, E2₆₆₁p, para diferenciarla de E2₆₆₁. La expresión de E2₆₆₁p ha sido evaluada mediante inmunodetección con un anticuerpo anti-E2 de conejo así como con un anticuerpo monoclonal anti-6His, en el sobrenadante y en el sedimento de las células Tni tras 5 días de infección (Figura 60A). La mayor parte de la proteína se queda en el interior celular, aunque una parte es secretada al exterior. E1 se expresa en el sedimento celular, observándose un patrón de bandas de masas moleculares muy distintas, debidas a su asociación con E2.

Con el fin de optimizar la producción de proteína en el sobrenadante, se monitorizó su expresión en el sobrenadante a diferentes tiempos de infección (1, 2, 3, 4, y 5 días), comprobándose que la secreción de E2₆₆₁p es mayor en el 4º día de infección (Figura 60B), lo que difiere del resto de construcciones realizadas hasta el momento.

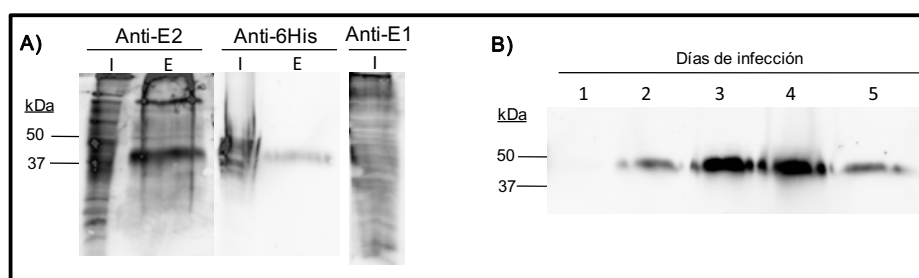


Figura 60. Expresión de E2₆₆₁p en células de insecto Tni. A) Expresión intracelular (I) y expresión en el sobrenadante o extracelular (E). La detección se ha realizado con un anticuerpo anti-E2 de conejo, con un anticuerpo monoclonal anti-6His y con un anticuerpo monoclonal anti-E1 (A4). B) Expresión en el sobrenadante en función de los días de infección. La detección se ha realizado con un anticuerpo anti-6His.

La proteína secretada al medio extracelular de las células Tni se purificó mediante una columna de Ni-NTA-agarosa. La proteína purificada con un elevado grado de pureza, determinado mediante PAGE-SDS (Figura 61A), presenta una masa molecular unos 15 kDa superior a la teórica deducida partir su secuencia de aminoácidos, lo que se debe a las glicosilaciones, como se ha observado también en el caso de E2₆₆₁ (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009). Prácticamente la totalidad de la proteína se retiene en la columna, y no aparece en los lavados (Figura 61B). La elución con Imidazol 200 mM permite obtener 1

mg de proteína por litro de cultivo, rendimiento que es seis veces inferior al obtenido con E2₆₆₁ debido a los bajos niveles de secreción de proteína. Tras su purificación, se dializó la proteína en un tampón adecuado.

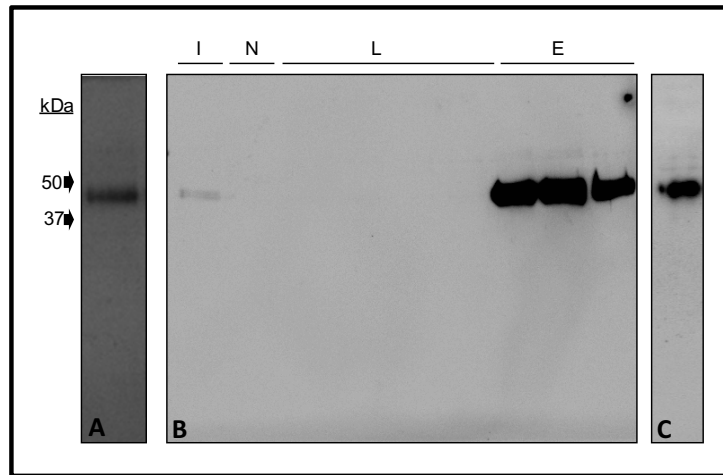


Figura 61. Purificación de E2_{661p}. Panel A) Tinción con azul de Coomassie de la proteína purificada. Panel B) inmunodetección con anti-6His de la proteína purificada. I: medio inicial; N: no retenido; L: lavados con tampón con imidazol 10 y 20 mM; E: elución con tampón con imidazol 200 mM. Panel C) Inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-E2 de cabra de la proteína purificada y dializada.

El análisis de aminoácidos con esta proteína no se pudo llevar a cabo debido a su baja concentración (80 µg/ml). En cambio, se llevó a cabo la determinación del extremo amino terminal de la proteína con el fin de conocer si se había procesado correctamente. La secuencia de los 10 primeros aminoácidos obtenida fue: ETHVHHHHHH, que corresponde a los 4 primeros aminoácidos de E2, que se introdujeron antes de la secuencia de His, y a las 6 His introducidas para facilitar la purificación de la proteína. Por lo tanto, la proteína ha sido procesada adecuadamente por las proteasas de las células de insecto, tras el residuo 383 de E1.

5.3.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Se han realizado espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano y espectros de emisión de fluorescencia de E2₆₆₁p con el fin de comprobar si al plegarse E2 en presencia de E1 se produce un cambio en la conformación de la proteína con respecto a E2₆₆₁.

El espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de E2₆₆₁p presenta un mínimo en torno a 206 nm con una elipticidad molar por residuo de -5200 grado·cm²·dmol⁻¹, indicativo de la existencia de un porcentaje relativamente alto de estructura aperiódica (Figura 62A). Empleando el método CCA se han calculado los porcentajes de estructura secundaria experimentales a partir de los espectros mostrados (Tabla 14). Al igual que E2₆₆₁, la proteína E2₆₆₁p presenta un alto porcentaje de estructuras β y aperiódica, siendo muy bajo el contenido en hélice α . Los datos obtenidos demuestran que no se han producido variaciones importantes en la estructura secundaria de E2₆₆₁ cuando se pliega en presencia de E1.

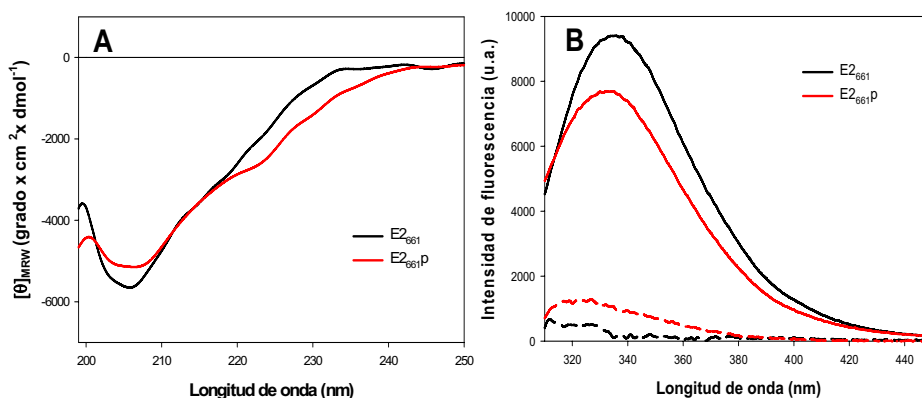


Figura 62. Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (A) y de emisión de fluorescencia (B) de E2₆₆₁p en comparación con E2₆₆₁. Los espectros se registraron en tampón Mops 30 mM pH 7.0, NaCl 100 mM a temperatura ambiente. (A) La concentración de proteína empleada es de 0.08 mg/ml y paso óptico de 0.1 cm. Los espectros son el resultado de 5 acumulaciones y han sido corregidos frente a las contribuciones del tampón. (B) La concentración de proteína empleada fue de 0.05 mg/ml. Se muestran los espectros obtenidos al excitar con una longitud de onda de 275 nm (—), y la contribución de las tirosinas (---), calculada según se describe en el apartado 4.13.1 de Materiales y Métodos.

En el espectro de emisión de fluorescencia de E2₆₆₁p (Figura 62B) la posición del máximo de emisión (332 nm) indica que los Trp de la proteína se encuentran en un microentorno relativamente poco hidrofóbico, al igual que se observa con E2₆₆₁. Además, la emisión de Tyr es muy baja en ambas proteínas. Estos datos indican que no se producido grandes variaciones en el microentorno de los fluoróforos de la proteína E2₆₆₁p con respecto a E2₆₆₁, si bien parece que E2₆₆₁p presentaría un plegamiento más compacto al existir un pequeño desplazamiento en el máximo de emisión (2 nm hacia el azul) con respecto a E2₆₆₁.

% Estructura secundaria	E2 ₆₆₁		E2 ₆₆₁ p	
	E	T	E	T
Hélice α	0	2	7	2
Estructura β	51	34	53	34
No ordenada	49	64	40	64

Tabla 14. Porcentajes de estructura secundaria de E2₆₆₁p en comparación con E2₆₆₁. Los porcentajes de estructura secundaria experimentales (E) fueron obtenidos aplicando el método CCA (Perczel *et al.*, 1991) a los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, mientras que los teóricos (T) se obtuvieron mediante el método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) para tres componentes.

5.3.4. CARACTERIZACIÓN OLIGOMÉRICA

Con el fin de comprobar si se han producido cambios en el estado de agregación de la proteína E2₆₆₁p, se han aplicado las proteínas E2₆₆₁ y E2₆₆₁p en geles PAGE-SDS, en presencia o ausencia del agente reductor β -mercaptoetanol (Figura 63). De esta forma se observó que la proteína E2₆₆₁p migra en forma de monómero en condiciones desnaturalizantes y reductoras, mientras que cuando se preservan los puentes disulfuro, migra en forma de cuatro bandas que corresponden a las formas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica, al igual que E2₆₆₁, aunque se observa un porcentaje de monómero

muy superior con respecto la proteína plegada en ausencia de E1. Este resultado puede deberse a que la proteína está mucho más diluida en el medio extracelular de las células de insecto, dada su baja secreción, y por tanto, las interacciones intermoleculares son menos frecuentes, lo que resulta en una disminución de la agregación de la proteína.

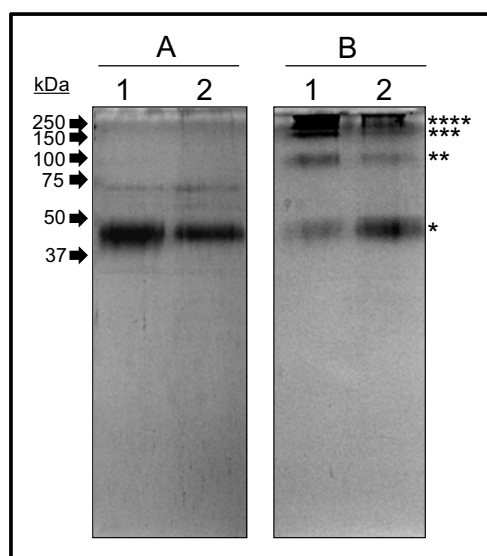


Figura 63. PAGE-SDS al 15% de la proteína E2₆₆₁ y E2_{661p} en (A) presencia de SDS 1% (p/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v) y (B) en condiciones no reductoras. (1) E2₆₆₁, (2) E2_{661p}. (*) Monómero; () Dímero; (***) Trímero; (****) Tetrámero.**

5.3.5. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA

Para comprobar si la presencia de E1 durante el plegamiento de la proteína E2_{661p} afecta a su capacidad antigénica, se ha realizado un ensayo de inmunoensayo utilizando sueros de pacientes infectados por el HCV (sueros 1 a 8), así como de pacientes negativos frente al virus (sueros 9 y 10). Los resultados obtenidos (Figura 64) demuestran que no se producen alteraciones importantes en la conformación de la proteína, ya que E2_{661p} presenta el mismo patrón de reconocimiento que E2₆₆₁ por los anticuerpos presentes en los sueros positivos. La única diferencia observada entre ambas proteínas, es que se obtiene una A₄₉₀ un 30% inferior con E2_{661p} en todos los

sueros, lo que podría deberse a pequeñas variaciones en el plegamiento de la proteína que conducirían a una menor exposición de los epítomos de E2.

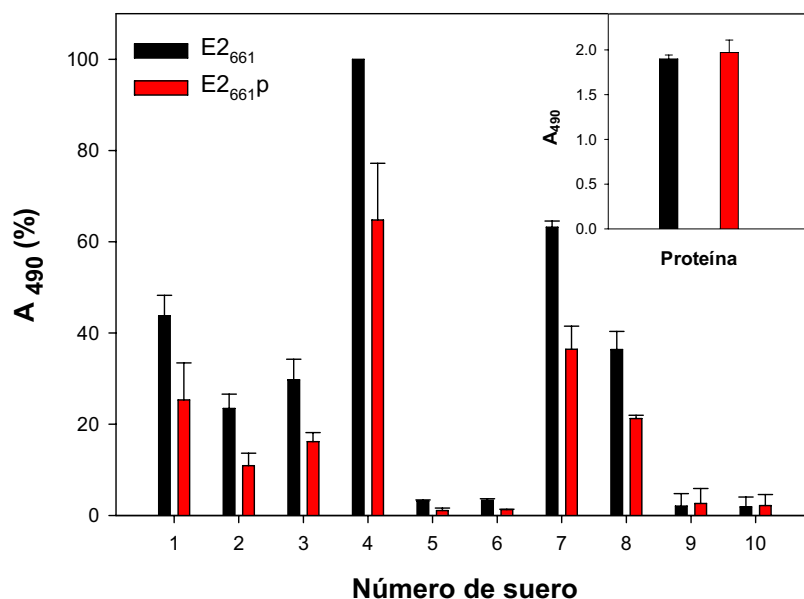


Figura 64. ELISA con los sueros de pacientes infectados por el HCV (sueros 1 a 8) y de pacientes sanos (sueros 9 y 10) para la detección de E2₆₆₁ y E2_{661p}. El ensayo se realizó tapizando las placas con 0.1 µg de proteína/pocillo y con los sueros diluidos 1:100-1:500. Se ensayaron un total de 8 sueros negativos y todos proporcionaron la misma absorbancia que los sueros 9 y 10. El valor del 100% de A₄₉₂ ha sido asignado a la absorbancia proporcionada por E2₆₆₁ con el suero nº 4, por ser el valor máximo obtenido con esta proteína. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes. Recuadro interior: ELISA con H53. Este ensayo se ha realizado tal y como se indica en el apartado 4.8.2 de Materiales y Métodos.

El reconocimiento de la proteína E2_{661p} por el anticuerpo conformacional H53, mediante la realización de un enzoinmunoensayo (Figura 62, recuadro interior), es muy similar al de E2₆₆₁, lo que pone una vez más de manifiesto que el plegamiento de E2 es independiente de la presencia de E1.

5.3.6. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA

Tras haber confirmado que no se producen variaciones estructurales importantes en la proteína E2_{661p} con respecto a E2₆₆₁, se procedió a comprobar si existen diferencias en la capacidad de la proteína para interaccionar y desestabilizar vesículas de PG a pH 5.0. Dado el bajo rendimiento de producción de esta proteína y la baja concentración en que se dispone de la misma, se han realizado ensayos de agregación, mezcla de lípidos y liberación de contenidos acuosos a una única concentración de proteína obteniendo las cinéticas de los tres tipos de ensayo.

En primer lugar se llevó a cabo el ensayo de agregación a una concentración de proteína de 1 μ M. En la Figura 65A puede observarse que la proteína E2_{661p} induce un 60% menos de agregación en comparación con E2₆₆₁. Al igual que se observó en el caso del mutante E2_{C652S}, este efecto puede estar causado por la presencia de una cantidad de monómero muy superior con respecto a la proteína E2₆₆₁.

A continuación se realizó el ensayo de mezcla de lípidos empleando la misma concentración de proteína que en el ensayo de agregación, 1 μ M (Figura 65B). Se observa que a esta concentración la proteína E2_{661p} es capaz de inducir mezcla de lípidos en vesículas de PG a pH ácido. Aunque la cinética del proceso es distinta con respecto a E2₆₆₁, tras los 900 segundos se llega a un valor muy similar de intensidad de fluorescencia a 595 nm. En las condiciones ensayadas la capacidad para inducir mezcla de lípidos no se ve afectada.

En cuanto a la cinética del proceso de liberación de contenidos acuosos, realizada con una concentración de proteína de 0.5 μ M (Figura 65C), se observa que es idéntica a la obtenida con E2₆₆₁.

Por lo tanto, la presencia de E1 en el plegamiento de E2 no afecta a las propiedades desestabilizantes de vesículas de ésta, salvo a su capacidad de producir agregación de vesículas.

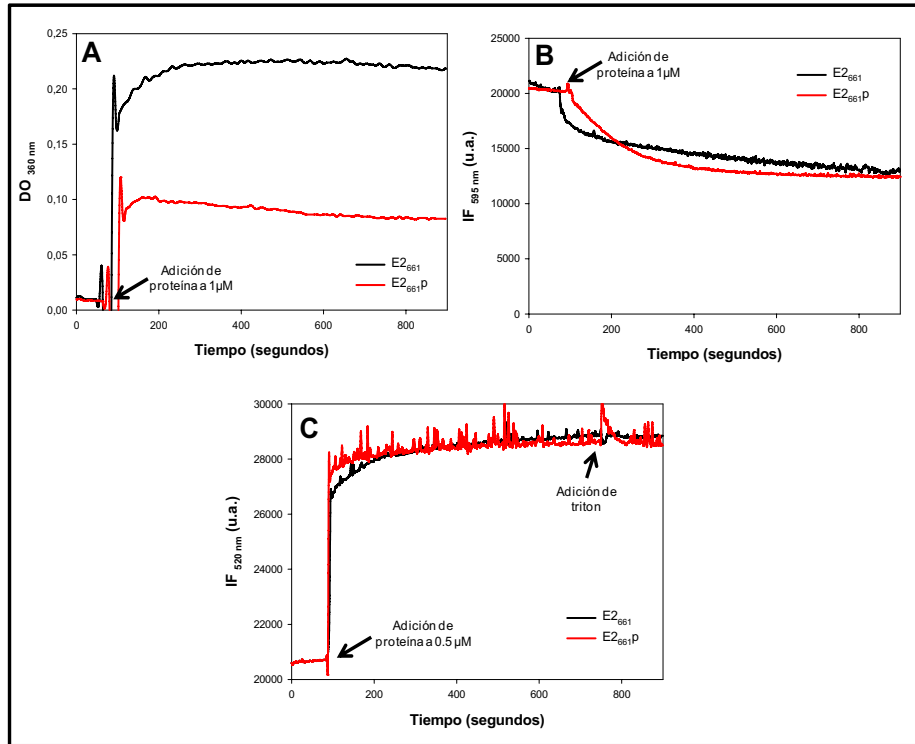


Figura 65. Cinéticas obtenidas en los ensayos de agregación (A), mezcla de lípidos (B) y liberación de contenidos acuosos (C) realizados empleando vesículas de PG a pH 5.0 como resultado de la adición de las proteínas E2₆₆₁ y E2_{661P}. El tampón empleado fue *Medium Buffer* a pH 5.0. Todas las medidas se han realizado a 37 °C durante 900 segundos y a una concentración de lípido de 0.14 mM siguiendo los protocolos especificados en la sección 4.16 de Materiales y Métodos.

5.4. IMPLICACIÓN DE E2 EN LA UNIÓN Y ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA

Los estudios realizados hasta el momento han demostrado que las glicoproteínas de la envuelta del HCV, E1 y E2, son esenciales en la unión y entrada del virus en las células diana, los hepatocitos humanos. Los factores celulares implicados en la interacción con el virus son varios. Entre ellos, se encuentran los receptores celulares CD81 y SRBI, para los cuales se ha demostrado una interacción directa con la proteína E2 (Pileri *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2002). Más recientemente, se ha descrito que, tras la unión del virus a los receptores anteriores, se produciría una migración del complejo virus-receptores a las uniones estrechas, donde intervendrían los co-receptores Claudina1 (Evans *et al.*, 2007) y Ocludina (Benedicto *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Ploss *et al.*, 2009). Una vez unido el virus, se produce su internación mediante endocitosis mediada por clatrina (Blanchard *et al.*, 2006), tras lo cual se produce la fusión entre las membranas viral y endosomal, gracias al pH ácido del endosoma que produce un cambio conformacional en las proteínas de la envuelta (Hsu *et al.*, 2003, Tscherne *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta esta información, se han llevado a cabo una serie de ensayos con el ectodominio de la glicoproteína E2, con el fin de completar su caracterización funcional además de obtener más información acerca del papel de esta proteína en las primeras etapas de la infección. Para ello, se han llevado a cabo estudios de unión a receptores celulares, de inhibición de las rutas de entrada, así como ensayos de bloqueo de la infección de HCVpp en células Huh7 de hepatoma humanas.

5.4.1. ESTUDIOS DE UNIÓN A LOS RECEPTORES CELULARES

En primer lugar se han realizado estudios de unión al receptor celular CD81, ya que su interacción con la proteína E2 es la mejor caracterizada hasta el momento. Estos estudios incluyen: un ensayo de ELISA de unión al LEL (lazo extracelular grande) de CD81 humano fusionado con GST (CD81-GST); FACS de unión a CD81 empleando células CHO transfectadas con CD81 humano

completo y ensayos de colocalización empleando microscopía confocal de inmunofluorescencia. Estos últimos estudios se han realizado también con los receptores SRBI y Claudina1.

5.4.1.1. ELISA de unión a CD81-GST

La interacción E2-CD81 se produce a través del LEL de CD81 (Petracca *et al.*, 2000). Por este motivo se ha llevado a cabo la expresión y purificación de una proteína de fusión que comprende los aminoácidos que forman el LEL de CD81 humano (residuos 116-202) fusionado con la proteína GST (Glutation S-Transferasa) en *E.coli* (BL21), tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Una vez obtenida la proteína CD81-GST, se procedió a comprobar la capacidad de unión de E2₆₆₁ al receptor celular mediante ensayo de inmunoensayo. Los resultados obtenidos en la Figura 66 muestran que la proteína E2₆₆₁ es capaz de unirse al LEL de CD81-GST de manera dependiente de la concentración, lo cual pone de manifiesto la adecuada conformación de la proteína E2₆₆₁ producida en baculovirus, o lo que es lo mismo, que la proteína presenta una conformación similar a la que presentaría en la partícula viral.

Al realizar este mismo ensayo con la proteína E2_{C652S} descrita en el apartado de Resultados 5.2, se comprobó que presentaba un 50% más de capacidad de unión a CD81 que E2₆₆₁ (Figura 66A). Este resultado podría explicarse por la presencia de una proporción de monómero prácticamente dos veces superior en este mutante con respecto a la proteína salvaje, quedando así expuestos más sitios de unión al receptor. Estos sitios no serían accesibles en los oligómeros presentes en E2₆₆₁.

Se evaluó también la capacidad de unión de la proteína E2_{661p} (descrita en el apartado 5.3 de Resultados) a CD81-GST. Los resultados obtenidos (Figura 66B) ponen de manifiesto que su capacidad de unión a CD81 es muy similar a E2₆₆₁. Por tanto, las pequeñas variaciones observadas en la conformación de E2_{661p} en relación con E2₆₆₁ tampoco afectan a la capacidad de la proteína de unirse al receptor celular CD81.

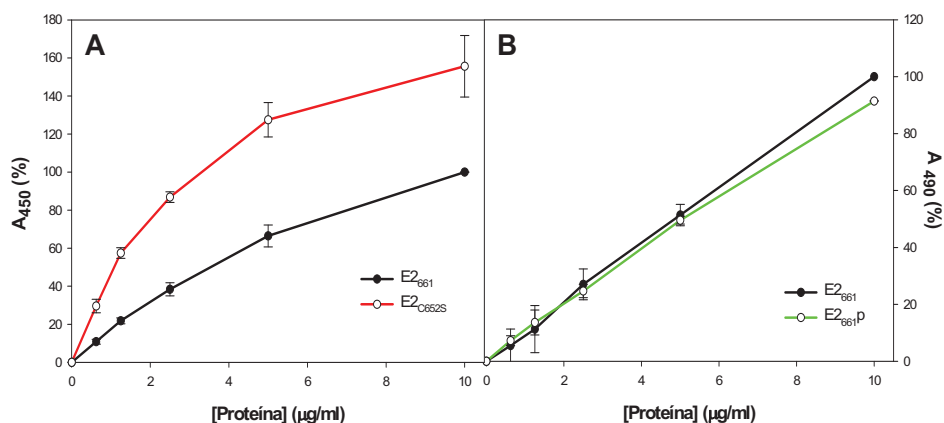


Figura 66. ELISA de unión a CD81-GST de (A) E2₆₆₁ y E2_{C652S} y de (B) E2₆₆₁ y E2_{661P}. El ensayo se realizó tapizando las placas con 0.3 µg de CD81-GST/pocillo y añadiendo proteína E2 a diferentes concentraciones. Como control negativo se añadió tampón PBST en lugar de proteína. El revelado se ha realizado siguiendo el protocolo especificado en el apartado 4.8.3. de Materiales y Métodos (A) o en el apartado 4.8.1. de Materiales y Métodos (B). El valor del 100% ha sido asignado al valor de A₄₅₀ (A) o de A₄₉₀ (B) obtenido con la mayor concentración de proteína E2 en cada experimento. Se muestran los valores medios obtenidos en tres experimentos independientes así como las desviaciones estándar.

Por otro lado, un estudio reciente reveló que los sitios de unión a CD81 en la proteína E2 podrían estar bloqueados por la región HVR1 (residuos 384-410) de la proteína (Bankwitz *et al.*, 2010). Para comprobar esta hipótesis y dado que se dispone de un mutante que carece de esta región, E2₄₃₀, que comprende los aminoácidos 430 a 661 de E2 y que fue descrito en una tesis anterior del grupo (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007), se procedió a realizar el ELISA de unión a CD81-GST con este mutante. Como además no se dispone de un control negativo adecuado para comprobar la especificidad del ensayo se llevó a cabo el diseño de un mutante de E2 que carece de los residuos 522 a 535 de la proteína, E2_{Δ522}. El sitio de unión a CD81 en E2 no ha sido determinado inequívocamente, pero muchos estudios apuntan a que algunos de los residuos comprendidos en esta región son importantes para la unión a CD81 (Drummer *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2006; Roccasecca *et al.*, 2003; Rothwangl *et al.*, 2008; Rychlowska *et al.*, 2011). Dicho mutante ha sido clonado, expresado y purificado de la misma manera que los mutantes de delección simples de los péptidos de fusión de E2₆₆₁, recogidos en el apartado 5.1 de

Resultados, y presenta características estructurales muy similares al ectodominio completo de E2 (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos en el ELISA de unión a CD81 (Figura 67) muestran que, efectivamente, la proteína E2₄₃₀ presenta una capacidad mayor para interaccionar con CD81 (un 30% más que E2₆₆₁), lo que confirma la hipótesis del bloqueo del sitio de unión a CD81 por la región HVR1. Por otro lado, el control realizado con el mutante E2_{Δ522} revela que esta proteína sólo conserva el 40% de la capacidad de E2₆₆₁ para interaccionar con CD81, y confirma la especificidad de la unión E2-CD81.

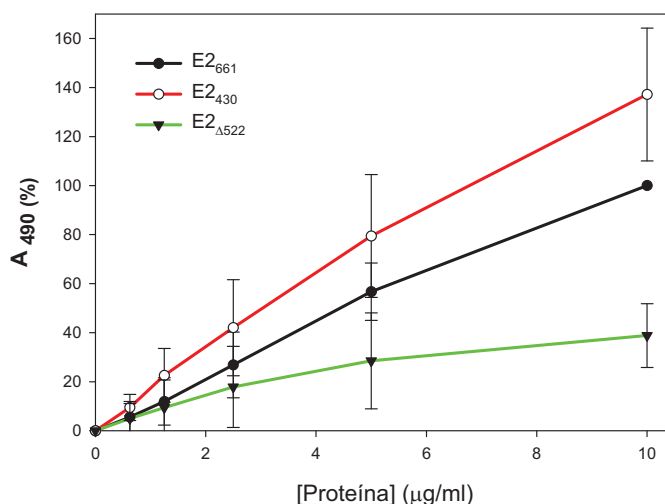


Figura 67. ELISA de unión de E2₄₃₀ y E2_{Δ522} a CD81-GST. El ensayo se realizó tapizando las placas con 0.3 μg de CD81-GST/pocillo y añadiendo proteína E2 a diferentes concentraciones. Como control positivo se ha usado E2₆₆₁. El revelado se ha realizado siguiendo el protocolo especificado en el apartado 4.8.1. de Materiales y Métodos. El valor del 100% ha sido asignado al valor de A₄₉₀ obtenido con la mayor concentración de proteína E2₆₆₁ en cada experimento. Se muestran los valores medios obtenidos en tres experimentos independientes así como las desviaciones estándar.

5.4.1.2. FACS de unión a CD81

Con el objetivo de comprobar si la proteína E2₆₆₁ es capaz de unirse a CD81 completo en un contexto celular, se ha procedido a transfectar células CHO con el receptor CD81 humano completo. Para ello se generaron partículas

virales transfectando las células HEK 293T con los plásmidos pLNCX-CD81, pMLV-VSV-G y pMLV-Gag-Pol (ver apartado 4.20 de Materiales y Métodos) y, tras la infección de células CHO con las partículas generadas, las células transfectadas fueron seleccionadas con el antibiótico geneticina. En la Figura 68 se muestra el histograma obtenido al medir la fluorescencia de las células CHO transfectadas con CD81 tras ser incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD81 humano (JS81 de BD Pharmigen) y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa flúor 488. El nivel de transfección obtenido fue del 50%, si bien las células CHO sin transfectar expresan algo de CD81 en su membrana, o el anticuerpo empleado presenta una unión inespecífica a estas células.

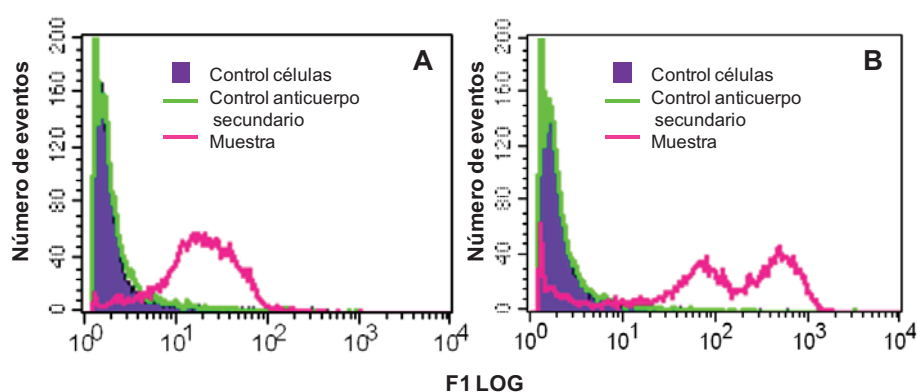


Figura 68. Medida de la transfección de CD81 en células CHO por FACS. (A) Células CHO sin transfectar. (B) Células CHO transfectadas con CD81. El receptor CD81 expresado en la superficie de estas células fue detectado con un anticuerpo monoclonal anti-CD81 (JS81) y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa flúor 488.

A continuación se procedió a realizar un ensayo de unión empleando las proteínas E2₆₆₁ y E2_{0652S}. Las células CHO transfectadas con el receptor se incubaron con dichas proteínas durante 1 hora a 4 °C, para impedir la internación de las proteínas. La presencia de la proteína E2 unida a la superficie celular se detectó con un anticuerpo policlonal anti-E2 de conejo y un anticuerpo secundario marcado con Alexa flúor 488. Además, con el fin de comprobar la especificidad de la unión E2-CD81 se intentó bloquear dicha unión empleando un anticuerpo dirigido frente al LEL de CD81 (JS81), que se preincubó con las

células antes de añadir las proteínas E2₆₆₁ y E2_{C652S}. Como control negativo se usaron células CHO sin transfectar.

En la Figura 69 se muestran los histogramas obtenidos en las medidas por FACS. Se observa que ambas proteínas se unen a las células CHO sin transfectar, siendo mayor la unión a las células transfectadas. Mediante la preincubación de las células con el anticuerpo JS81, que bloquea el sitio de unión al receptor, se observa que el nivel de unión de la proteína permanece igual en células CHO sin transfectar, mientras que en las células transfectadas con el receptor el nivel de unión de las proteínas recombinantes disminuye prácticamente al nivel obtenido en las células no transfectadas. Este resultado demuestra que la interacción E2-CD81 es específica, ya que la unión del anticuerpo bloqueante JS81 al receptor impide la unión de las proteínas a CD81.

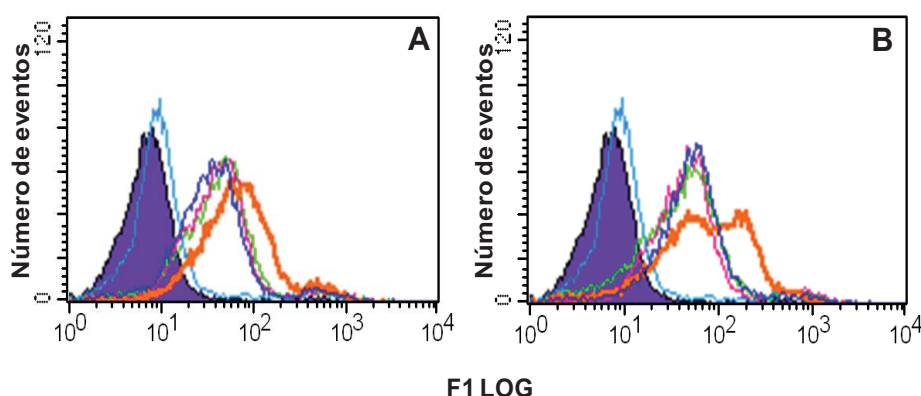


Figura 69. FACS de unión de E2₆₆₁ (A) y E2_{C652S} (B) a CD81 transfectado en células CHO. Las células fueron incubadas durante 1 hora a 4 °C con las proteínas recombinantes E2₆₆₁ y E2_{C652S} a 10 µg/ml. Las proteínas fueron detectadas con un anticuerpo policlonal anti-E2 de conejo y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa flúor 488. Para determinar la especificidad de la unión E2-CD81 se preincubaron las células con el anticuerpo anti-CD81 (JS81) a 20 µg/ml. Control de anticuerpo primario y secundario en células CHO sin transfectar (■), y transfectadas (—). Unión de proteína recombinante a células CHO sin transfectar (—), a células CHO transfectadas (—), a células CHO sin transfectar, preincubadas con JS81 (—), y a células CHO transfectadas, preincubadas con JS81 (—). Se muestran los datos obtenidos en un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Los datos numéricos de los valores de Intensidad de fluorescencia en el máximo se incluyen en la Tabla 15. Para el cálculo del valor de intensidad de fluorescencia el parámetro usado ha sido la mediana, y no la media, por ser muy

sensible a la distribución de la cola. Con respecto a las células sin transfectar, se observa un aumento del 40% con E2₆₆₁ y un 63% con E2_{C652S} en el máximo de fluorescencia al incubar la proteína con células transfectadas con CD81. Este aumento es sólo de un 16-22%, respectivamente, al preincubar las células CHO-CD81 con el anticuerpo JS81, no observándose disminución en el valor del máximo de fluorescencia con células CHO. Por tanto, la capacidad de unión de E2_{C652S} al receptor CD81 completo es superior a la de E2₆₆₁, tal y como se observó en el ELISA de unión a CD81-GST.

Proteína	JS81	CHO	CHO-CD81
E2 ₆₆₁	-	55±22	77±24
	+	49±20	57±29
E2 _{C652S}	-	49±8	80±11
	+	49±15	60±10

Tabla 15. Datos de Intensidad de fluorescencia en el máximo calculados a partir de los histogramas obtenidos mediante FACS. El parámetro que se muestra es la mediana de cada histograma de la Figura 69. Se muestran los valores medios obtenidos en tres experimentos independientes y sus desviaciones estándar.

5.4.1.3. Estudios de colocación con los receptores celulares CD81, SRBI y Claudina1.

Con el objetivo de observar la colocación de la proteína E2₆₆₁ con algunos de sus receptores celulares, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia empleando células Huh7. Para ello, se incubaron las células Huh7 con la proteína E2₆₆₁, y posteriormente se marcaron la proteína y el receptor celular con anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos.

En la Figuras 70, 71 y 72 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En el caso de los receptores CD81 y SRBI se observa colocación con la proteína E2₆₆₁, tanto en la membrana como en el interior

celular, siendo mayor la colocalización observada con SRBI. En cambio con Claudina1 no se observa colocalización. Estos resultados indican la existencia de una interacción directa de E2 con CD81 y SRBI, mientras que podría ser indirecta con Claudina1. En este sentido, el mecanismo más aceptado actualmente para la unión del virus a las células hospedadoras, consiste en que tras la interacción de E2 con CD81, el complejo migraría a las uniones estrechas donde interaccionaría con Claudina1. De hecho existen diversos estudios que han demostrado la interacción de esta proteína con CD81 (Harris *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), no habiéndose demostrado una interacción directa con E2.

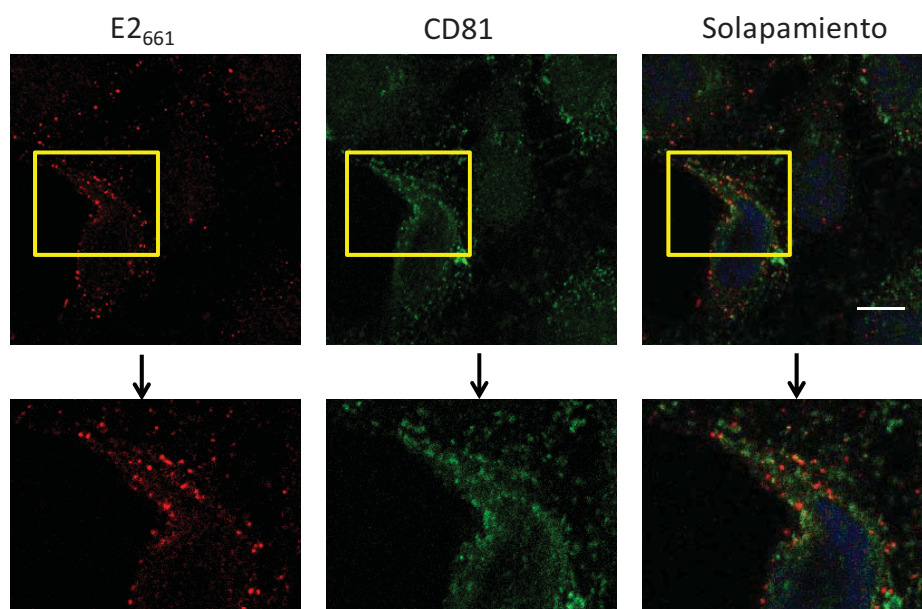


Figura 70. Colocalización de E2₆₆₁ con CD81. Las células Huh7 fueron incubadas con la proteína E2₆₆₁ a 25 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La detección de E2 se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (Austral Biologicals) y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 594 (rojo). El receptor celular fue detectado empleando un anticuerpo policlonal anti-CD81 de conejo (Santa Cruz Biotechnology), y un anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde). Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst (azul). Barra de escala, 20 µm.

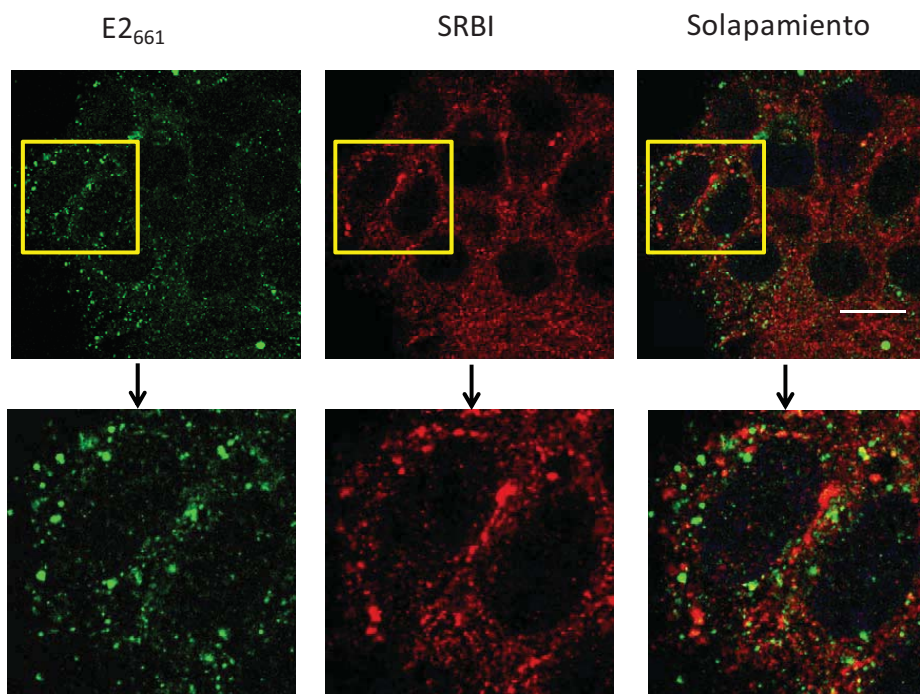


Figura 71. Colocalización de E2₆₆₁ con SRBI. Las células Huh7 se incubaron con E2₆₆₁ a 25 µg/ml durante 1 h a 37 °C. E2 fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (Austral Biologicals) y un anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde). SRBI fue detectado con un anticuerpo policlonal anti-SRBI de conejo (Acris) y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (azul). Barra de escala, 20 µm.

5.4.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LAS RUTAS DE ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA

El objetivo de este estudio fue obtener información acerca del mecanismo de entrada del HCV en sus células hospedadoras a través del análisis del efecto que ejercen distintas drogas en la internación de la proteína E2₆₆₁ en las células Huh7 mediante microcopía confocal. Las drogas empleadas van dirigidas a diferentes vías de entrada, tales como la endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina (clorpromazina), la endocitosis mediada por receptor (Óxido de fenilarsina o PAO), y la fagocitosis y macropinocitosis (citocalasina D, CytD). También se usó β-metil-ciclodextrina (β-mCD), que extrae el colesterol de las membranas celulares y elimina las regiones ricas en colesterol como los

TEMs (regiones ricas en tetraspaninas), donde se encontraría el receptor celular CD81. Por último, se empleó un compuesto que inhibe la acidificación endosomal (NH_4Cl) con el fin de observar su efecto en el transporte de la proteína E2 a los endosomas.

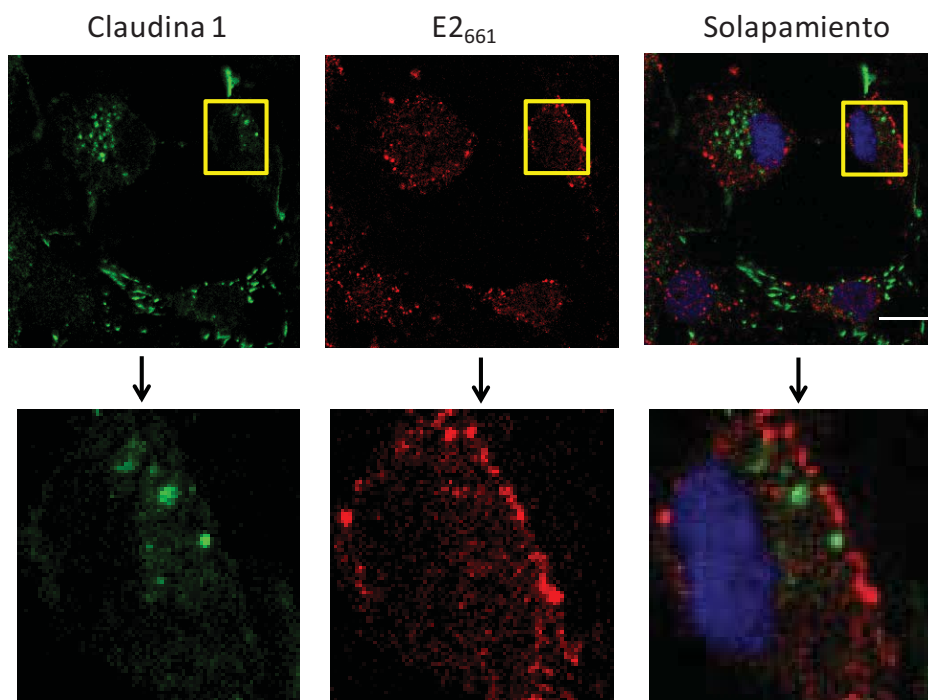


Figura 72. Colocalización de E2₆₆₁ con Claudina1. Las células Huh7 fueron incubadas con E2₆₆₁ a 25 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h a 37 °C. La detección de E2 se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (H53) y un anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor 594 (rojo). El receptor celular fue detectado con un anticuerpo anti-Claudina1 policlonal de conejo (Invitrogen) y un anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde). Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (azul). Barra de escala, 40 μm .

En todos los casos, se incubaron las células con la droga durante 30 min a 37 °C (excepto con el NH_4Cl que se preincuba durante 24 h), tras lo cual se añadió la proteína E2₆₆₁ y, en presencia de la droga, se incubó con las células durante 1 h a 37 °C.

En primer lugar se llevó a cabo la inhibición de la vía de entrada mediante endocitosis mediada por clatrina. Para ello se preincubaron las células con el inhibidor químico clorpromazina. Como control negativo se usaron células sin

droga y como control positivo, se empleó la transferrina, ya que es una proteína que tras la unión a su receptor, es endocitada por esta vía (Dautry-Varsat *et al.*, 1983; Klausner *et al.*, 1983). En la Figura 73 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En ausencia de la droga la proteína E2₆₆₁ es capaz de internarse en las células Huh7, al igual que la transferrina. En cambio, en presencia de la clorpromacina ambas proteínas se quedan unidas en la membrana, lo que demuestra que la internación de ambas se produce por esta vía.

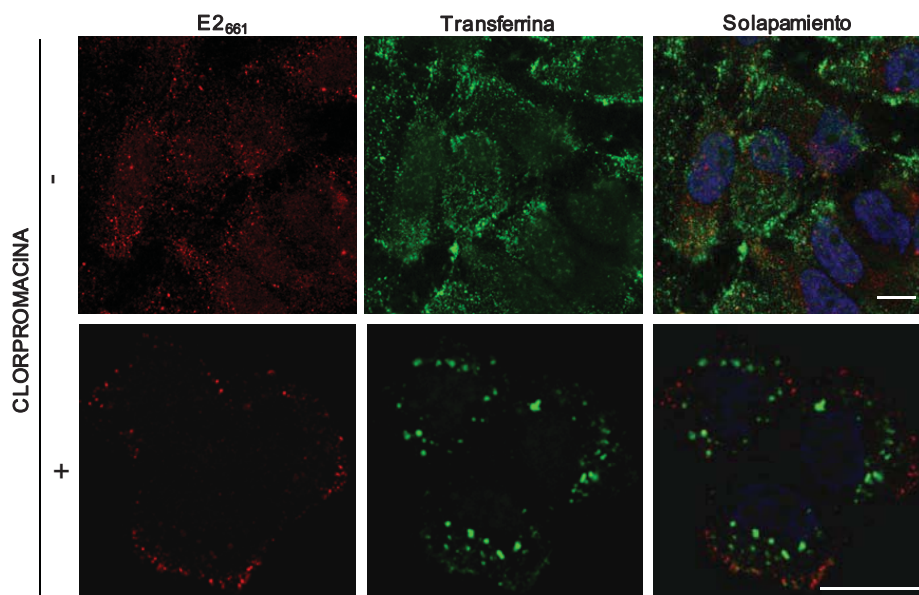


Figura 73. Inhibición de la endocitosis de E2₆₆₁ mediada por clatrina en células Huh7 mediante su tratamiento con clorpromacina. Las células Huh7 fueron preincubadas con clorpromacina a una concentración final de 15 µg/ml, durante 30 min a 37 °C. Se realiza paralelamente un control sin la droga, preincubando las células con DMSO, ya que es el disolvente de la droga. Pasado este tiempo, se añade la proteína E2₆₆₁ a 25 µg/ml durante 1h a 37 °C y transferrina conjugada con FITC (verde) a 20 µg/ml, 10 min a 37 °C. La proteína E2 fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (Austral Biologicals) y con un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Barras de escala, 20 µm.

En segundo lugar se preincubaron las células Huh7 con PAO, que inhibe la internación de los receptores de la superficie celular. Como control positivo se empleó también la transferrina, ya que para su endocitosis es necesaria su unión al receptor de transferrina. Las imágenes obtenidas en microscopía confocal

(Figura 74) muestran que E2₆₆₁ en presencia de la droga se queda retenida en la membrana en su mayor parte, existiendo una parte de proteína que sigue siendo endocitada, probablemente por otro mecanismo de entrada alternativo.

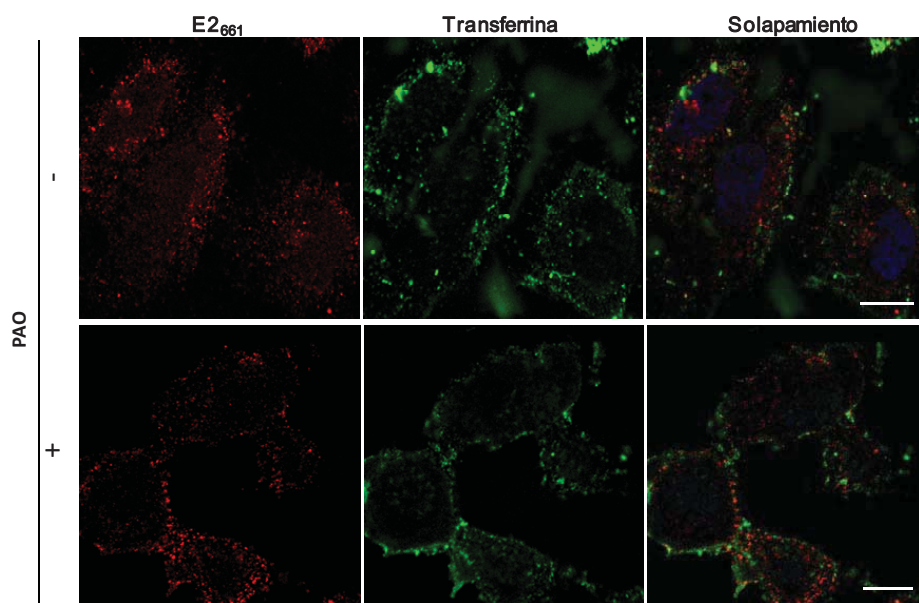


Figura 74. Inhibición de la endocitosis de E2₆₆₁ mediada por receptor en células Huh7 mediante su tratamiento con PAO. Las células Huh7 fueron preincubadas con PAO a una concentración final de 5 μ M, durante 30 min a 37 °C. Se realiza paralelamente un control sin la droga, preincubando las células con DMSO, ya que es el disolvente de la droga. Pasado este tiempo, se añade la proteína E2₆₆₁ a 25 μ g/ml durante 1h a 37 °C, y transferrina conjugada con FITC (verde) a 20 μ g/ml, 10 min a 37 °C. La proteína E2 fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (Austral Biologicals) y con un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Barras de escala, 20 μ m.

A continuación se empleó la droga citocalasina D (CytD), con el fin de inhibir los mecanismos de endocitosis mediados por filamentos de actina, como son la macropinocitosis y la fagocitosis. En este caso se empleó como control positivo la faloidina, ya que es un marcador de filamentos de actina. En la Figura 75 puede apreciarse el efecto de la CytD en la entrada de E2₆₆₁, observándose que la proteína es endocitada en presencia de la droga, lo que indica que esta vía de entrada no juega un papel importante en la endocitosis de E2₆₆₁.

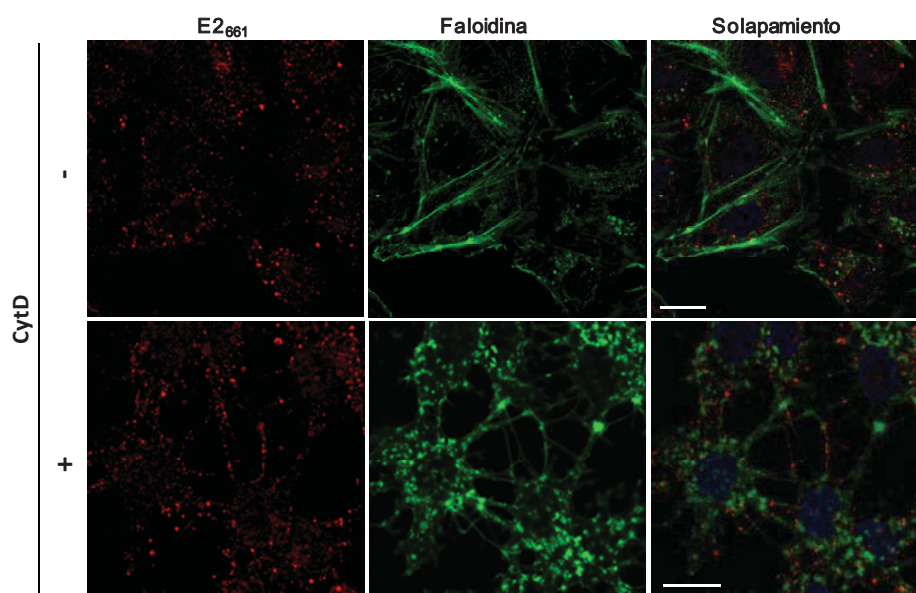


Figura 75. Inhibición de la endocitosis de E2₆₆₁ mediada por filamentos de actina en células Huh7 mediante su tratamiento con CytD. Las células Huh7 fueron preincubadas con CytD a una concentración final de 10 μ M, durante 30 min a 37 °C. Se realiza paralelamente un control sin la droga, preincubando las células con DMSO, ya que es el disolvente de la droga. Pasado este tiempo, se añade la proteína E2₆₆₁ a 25 μ g/ml durante 1h a 37 °C, y faloidina conjugada con Alexa Flúor 488 (Invitrogen) (verde) a una dilución 1:1000, durante 30 min a 37 °C. La proteína E2 fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (Austral Biologicals) y con anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barras de escala, 20 μ m.

Estos datos indican que E2₆₆₁, una vez que interacciona con sus receptores celulares, se interna principalmente mediante una endocitosis mediada por receptor en vesículas revestidas de clatrina.

Se ha descrito que el receptor CD81 se localiza en regiones de la membrana ricas en colesterol y glicoesfingolípidos, los llamados TEMs. Se empleó la droga β -metil-ciclodextrina (β -mCD) que es capaz de extraer el colesterol de las membranas celulares, eliminando así las regiones TEM. En este caso el control positivo usado ha sido la subunidad B de la toxina del cólera, que se une a lípidos localizados en las balsas lipídicas o *rafts*, también ricas en colesterol.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 76. Se observa que, en presencia de la droga, la proteína E2₆₆₁ presenta una localización subcelular

diferente, más centrada en la membrana. Por tanto, la droga afecta a la endocitosis de la proteína, debido probablemente a la falta de la interacción entre E2 y su receptor celular CD81.

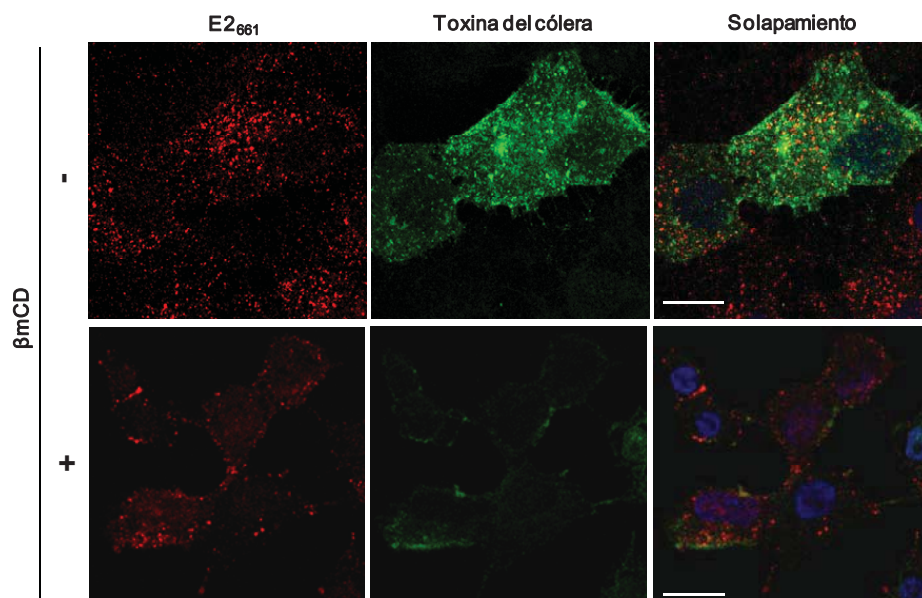


Figura 76. Efecto de la eliminación del colesterol de las membranas de las células Huh7 mediante su tratamiento con β -metil-ciclodextrina (β -mCD) en la internación de E2₆₆₁. Las células Huh7 fueron preincubadas con β -mCD a una concentración final de 10 mM, durante 30 min a 37 °C. Se realiza paralelamente un control sin la droga, preincubando las células con PBS, ya que es el disolvente de la β -mCD. Pasado este tiempo, se añade la proteína E2₆₆₁ a 25 μ g/ml durante 1h a 37 °C, y la subunidad B de la toxina del cólera conjugada con FITC (verde) a 1 μ g/ml 10 min a 37 °C. La proteína E2 fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (Austral Biologicals) y con anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barras de escala, 40 μ m.

Por último, se estudió el efecto de la inhibición de la acidificación de los endosomas mediante el empleo de NH_4Cl . Una vez unida y endocitada, la proteína E2₆₆₁, es transportada hacia los endosomas de la célula, donde gracias al pH ácido que existe en su interior sufriría un cambio conformacional que permitiría la fusión, en el caso del virus completo, entre las membranas celulares y virales. El efecto de esta droga se muestra en la Figura 77. Se han marcado los endosomas con EEA1 ("Early Endosome Antigen 1"), que es una proteína

asociada a los endosomas tempranos, para ver variaciones en su localización subcelular con E2₆₆₁, en ausencia y en presencia de la droga. Se observa, en efecto, un cambio en el marcaje de la proteína en presencia de la droga, desapareciendo la colocalización observada con los endosomas en ausencia de la droga. Parece que el aumento del pH en el interior de los endosomas debido al tratamiento de las células con cloruro amónico estaría impidiendo la fusión entre las membranas del endosoma y las membranas de las vesículas que contienen E2. Por tanto, el pH ácido de los compartimentos intracelulares también juega un papel importante en la entrada y transporte intracelular de la proteína E2.

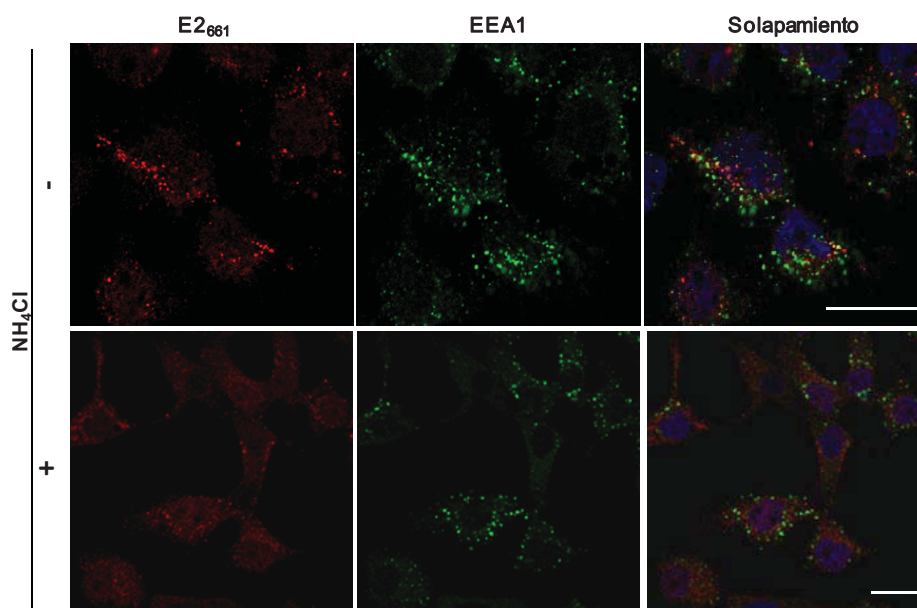


Figura 77. Inhibición de la acidificación de los endosomas de las células Huh7 mediante su tratamiento con NH_4Cl . Las células Huh7 fueron preincubadas con NH_4Cl a una concentración final de 25 mM, durante 24 h a 37 °C. Se realiza paralelamente un control sin la droga, preincubando las células con PBS, ya que es el disolvente del NH_4Cl . Pasado este tiempo, se añade la proteína E2₆₆₁ a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1h a 37 °C. Los endosomas fueron marcados empleando un anticuerpo de conejo anti-EEA1 (Abcam) y un anticuerpo secundario marcado con FITC. La proteína E2 fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-E2 (Austral Biologicals) y con anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barras de escala, 40 μm .

5.4.3. ESTUDIOS DE BLOQUEO DE LA INFECCIÓN DE HCVpp EN CÉLULAS Huh7

Las HCVpp constituyen una herramienta muy útil para el estudio de la unión y entrada del virus en la célula, ya que permiten determinar la infectividad mediada por las glicoproteínas E1 y E2 del HCV, y mimetizan las primeras etapas de la infección por el virus (Bartosch *et al.*, 2003a).

Con el fin de comprobar tanto si la proteína E2₆₆₁ recombinante como el anticuerpo de conejo generado frente a esta proteína (Rodríguez, M. Tesis Doctoral, 2007) son capaces de impedir la unión y entrada de estas partículas, se llevaron a cabo ensayos de bloqueo de la infección de las HCVpp en células Huh7.

5.4.3.1 Bloqueo de la infección de HCVpp por E2 soluble

En primer lugar, se procedió a generar las HCVpp mediante transfección de células HEK 293T, tal y como se indica en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Se generaron dos tipos de HCVpp: las primeras, llamadas **H77** (HCVpp H77), contienen las glicoproteínas E1 y E2 con una secuencia que corresponde al genotipo 1a línea H77, que presenta una elevada infectividad. Las segundas y llamadas **sin envoltura** (HCVpp sin envoltura), carecen de las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2, y sirven como control negativo de infección. Una vez obtenidas las HCVpp, se procedió a infectar células Huh7, midiéndose la infectividad como RLUs (Unidades Relativas de Luminiscencia) mediante el gen reportero de la luciferasa presente en las HCVpp. Las células Huh7 fueron incubadas con la proteína E2₆₆₁ a diferentes concentraciones, durante 1 hora a 37 °C, antes de la infección con las HCVpp. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 78.

Este ensayo fue repetido en varias ocasiones obteniéndose el mismo resultado: E2₆₆₁ no es capaz de bloquear la infección de las HCVpp H77. Se realizó este mismo ensayo con la proteína E2_{C652S} obteniéndose de nuevo un

resultado negativo. En cambio, el anticuerpo monoclonal anti-CD81 (JS81) sí es capaz de bloquear la infección por las HCVpp, lo que valida el experimento.

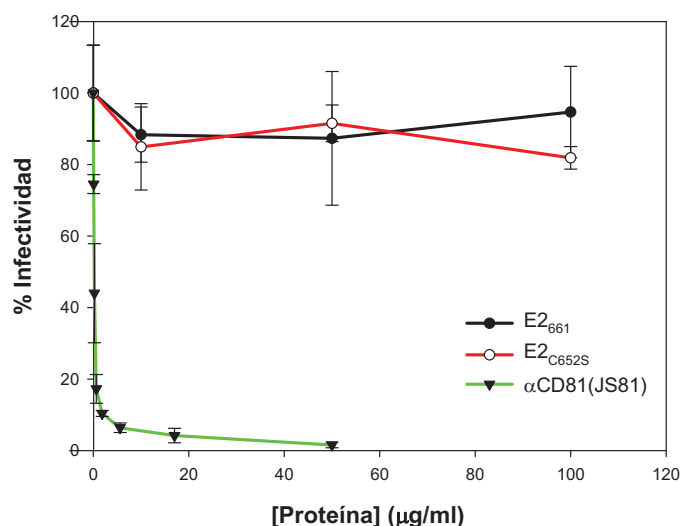


Figura 78. Ensayo de bloqueo de la infección de HCVpp en células Huh7 por E2₆₆₁ y E2_{C652S}. Las células Huh7, sembradas en un placa de 96 pocillos, son preincubadas con la proteína E2₆₆₁, E2_{C652S} o con el anticuerpo JS81 (control positivo) a las concentraciones indicadas, durante 1 h a 37 °C, tras lo cual se añade el mismo volumen de HCVpp, y se infectan la células siguiendo el protocolo especificado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. El valor del 100% de infectividad corresponde a la señal obtenida al infectar las células directamente con HCVpp H77. Como controles negativos de infección se han empleado células sin infectar y células infectadas con HCVpp sin envoltura, que proporcionaron una señal inferior al 1%. El ensayo se realiza en triplicados, representándose el valor medio y la desviación estándar.

Por último, se llevó a cabo el ensayo de bloqueo de la infección de HCVpp H77 por la proteína E2_{661p}, con el fin de comprobar si la pequeña alteración observada en la conformación de E2₆₆₁ es suficiente para bloquear la infección de las partículas. Se obtuvo que esta proteína, al igual que E2₆₆₁, no era capaz de bloquear la infección por las HCVpp en células Huh7 (datos no mostrados).

Atendiendo a estos resultados, se procedió a comprobar entonces la secuencia de la proteína E2₆₆₁ empleada en estos ensayos, viendo que corresponde al genotipo 1a pero de la línea PT. En cambio, la secuencia de las glicoproteínas de la superficie de las pseudopartículas empleadas corresponde al genotipo 1a, línea H77, lo que podría explicar que la secuencia del

[illegible]

A la vista de estas diferencias, el siguiente paso fue generar HCVpp H77 en las que se sustituye la secuencia de E2 H77 por la de E2 PT, para comprobar si la secuencia de la proteína E2 PT es infectiva.

El primer paso para la generación de las HCVpp con la secuencia de E1 línea H77 y de E2 línea PT (HCVpp **H77/PT**), fue sustituir el ADN codificante de E2 H77 en el plásmido pcDNA3.1(+)_{C171}E1E2-H77, por el ADN codificante de E2 PT a partir del plásmido pAcGP67-A-E1E2₇₄₆. El primer plásmido contiene la secuencia de las tres proteínas estructurales del HCV línea H77, desde el

En mayúscula aparece la secuencia de bases que hibridan con el molde, mientras que el sitio de restricción aparece subrayado. El sitio de restricción *Xba*I es necesario para la clonación de E2 PT en el vector pcDNA3.1(+).

Se amplificó el ADN codificante de E1 y E2 mediante PCR con los oligonucleótidos Gp67 (+) y E2-746 (-), y mediante digestiones con enzimas de restricción adecuadas tanto del fragmento de PCR obtenido como del plásmido pcDNA3.1(+)_{C171}E1E2-H77, como se muestra en el esquema de la Figura 80, se consiguió obtener el plásmido pcDNA3.1(+)_{C171}E1(H77)E2(PT).

Una vez obtenido el plásmido recombinante, se procedió a obtener pseudopartículas mediante la transfección de las células HEK 293T, y a infectar células Huh7 con las mismas para medir su infectividad. Como controles negativo y positivo de infectividad se han usado las HCVpp **sin envoltura** y las HCVpp **H77**, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que la infectividad de la construcción **H77/PT** es inferior a la de **H77** (Figura 81). Por tanto, la secuencia de E2 PT resulta ser infectiva, aunque la baja señal obtenida podría explicar que E2₆₆₁ no fuera capaz de inhibir la infectividad de las HCVpp secuencia H77, pues no tendría la afinidad suficiente para competir con la proteína E2 H77 en la unión a los receptores celulares.

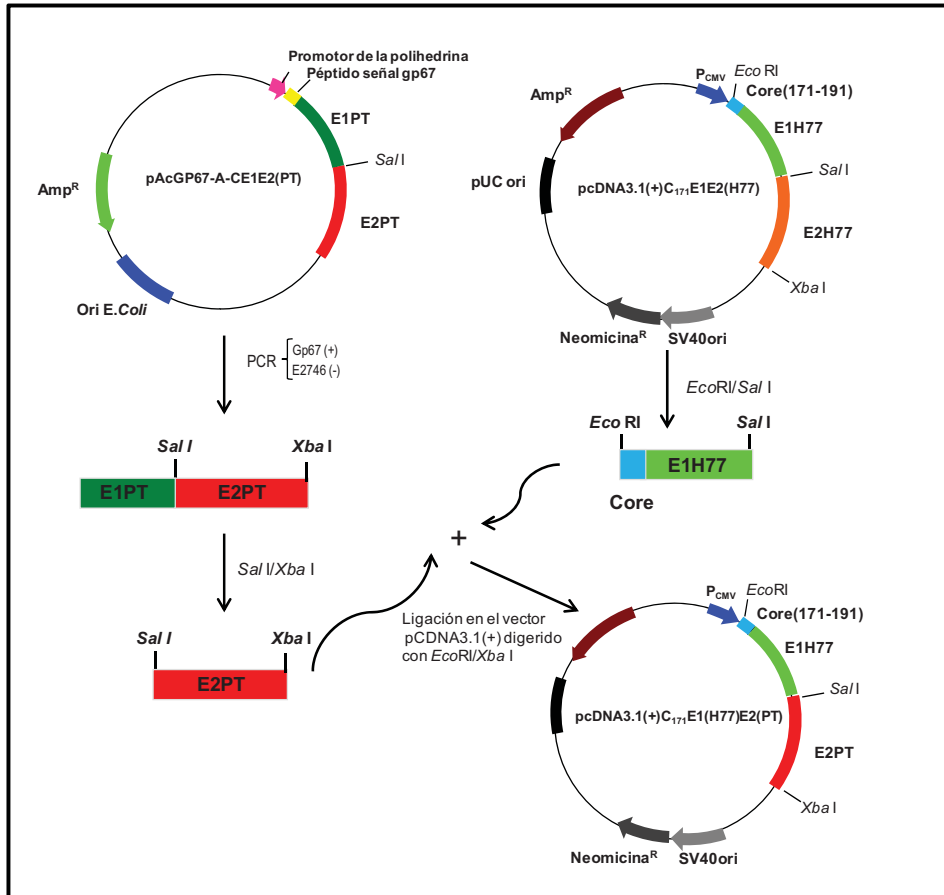


Figura 80. Esquema del protocolo seguido para la obtención del plásmido pcDNA3.1(+). El plásmido pAcGP67-A-E1E2₇₄₆ se usa como molde para amplificar el ADN codificante de E1 y E2 hasta el residuo 746 mediante PCR con los oligos Gp67 (+) y E2-746 (-). Este último oligo permite introducir el sitio de restricción Xba I en el extremo 3' de E2. La digestión del fragmento de PCR obtenido con las enzimas SalI/XbaI, permite obtener E2 PT. El plásmido pcDNA3.1(+) se digiere con las enzimas EcoRI/SalI, para obtener C₁₇₁E1 secuencia H77. El vector pcDNA3.1(+) se digiere con EcoRI/XbaI y se realiza una ligación a tres bandas con C₁₇₁E1 H77 y E2 PT.

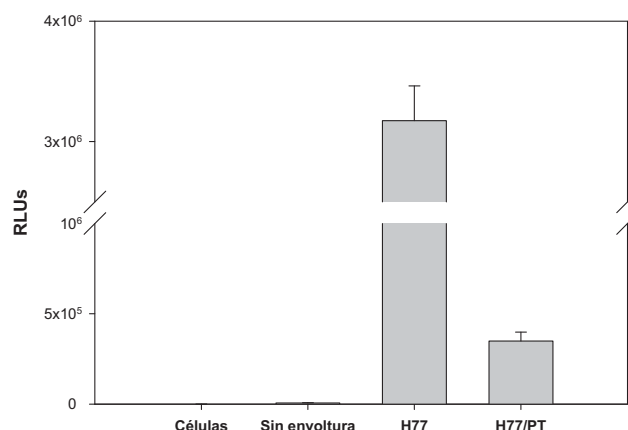


Figura 81. Infección de células Huh7 con HCVpp H77 y H77/PT. El ensayo se realizó en una placa de 24 pocillos, infectando con 150 μ l de HCVpp/pocillo durante 3 h a 37 °C. Cada medida se realiza por triplicado. Las RLUs han sido medidas tras tres días de infección a 37 °C. Este experimento es representativo de tres experimentos independientes.

Para comprobar el correcto procesamiento e incorporación de las glicoproteínas E1 y E2 en la superficie de las partículas, se evaluó mediante inmunodetección la expresión de E1 y E2, tanto en el lisado de las células HEK 293T transfectadas como en las partículas obtenidas. En el caso de las pseudopartículas, para conseguir ver la expresión de E1 y E2 fue necesario concentrarlas mediante ultracentrifugación, tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Tanto las HCVpp **H77** como la híbridas **H77/PT**, presentan una cantidad de E2 similar en su superficie, y además, E2 H77 y PT presentan un tamaño muy parecido, lo que indica que se han procesado adecuadamente. En cambio, la cantidad de E1 que se incorpora a las HCVpp **H77/PT** es inferior con respecto a **H77**, lo que podría explicar su menor infectividad con respecto a las HCVpp **H77** (Figura 82). Por tanto, parece que la secuencia de E2 PT podría ser menos infectiva que la secuencia de E2 H77 debido a que su interacción con E1 es menor.

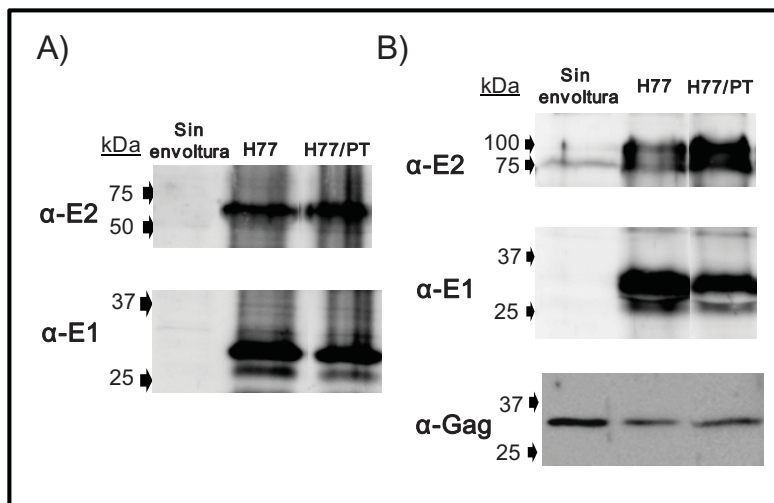


Figura 82. Inmunodetección de las glicoproteínas E1 y E2 presentes en el lisado de las células HEK 293T transfectadas (A) y en las HCVpp H77 y H77/PT purificadas (B). Para detectar E2 se han usado una mezcla de anticuerpos monoclonales, AP33 y ALP198. Para detectar E1 se empleó el anticuerpo monoclonal A4. La proteína Gag de las pseudopartículas fue detectada empleando un anticuerpo policlonal de rata, CRL1912.

5.4.3.2. Bloqueo de la infección de HCVpp por anti-E2₆₆₁ de conejo

Dado que se dispone de un anticuerpo policlonal de conejo anti-E2₆₆₁ secuencia PT (anti-E2-PT), purificado a partir del suero de un conejo inmunizado con E2₆₆₁ PT, se evaluó su capacidad para bloquear la infectividad de HCVpp H77.

Para ello, se preincubaron las HCVpp secuencia H77 con el anti-E2-PT de conejo durante 1 hora a 4 °C, tras lo cual se infectaron las células Huh7 con dichas partículas. Como control negativo de bloqueo de la infección se empleó PBS, ya que el anticuerpo fue purificado y dializado frente a este tampón. Como control positivo, se ha usado el anticuerpo monoclonal conformacional anti-E2 H48 (cedido amablemente por el Dr. Jean Dubuisson del Instituto Pasteur de Lille, Francia), cuya capacidad para bloquear la infección de estas partículas ya ha sido demostrada previamente (Bartosch *et al.*, 2003a).

En la Figura 83 se muestran los datos obtenidos, observándose que el anticuerpo anti-E2-PT de conejo es capaz de bloquear totalmente la infección de las HCVpp H77 en células Huh7 a una dilución de 1/128.

Por tanto, a pesar de que la proteína E2₆₆₁ PT no es capaz de bloquear la infección de las pseudopartículas H77, sí es capaz de provocar la generación de anticuerpos de neutralizar la infección de las mismas.

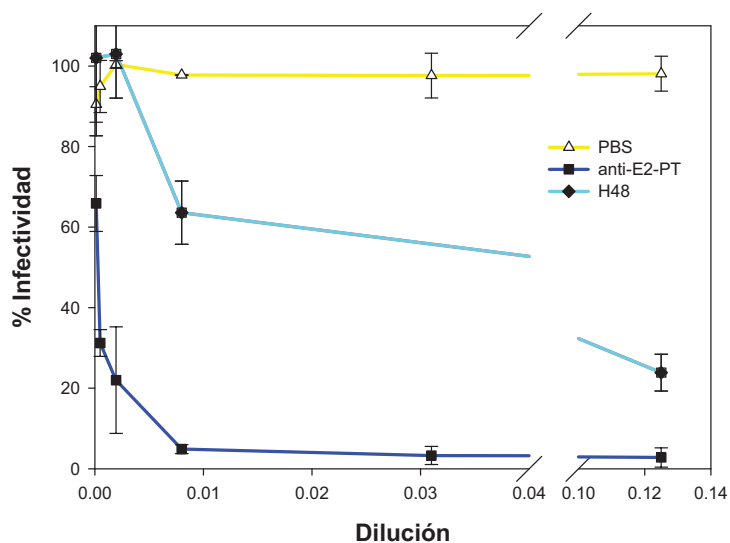


Figura 83. Ensayo de bloqueo de la infección de HCVpp en células Huh7 por anti-E2-PT de conejo. Las HCVpp H77 son preincubadas con los anticuerpos anti-E2 a las diluciones indicadas, durante 1 h a 4 °C, tras lo cual se infectan con ellas las células Huh7, sembradas en un placa de 96 pocillos, según el protocolo especificado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. El valor del 100% de infectividad corresponde a la señal obtenida al infectar las células directamente con HCVpp H77. Como controles negativos de infección se han empleado células sin infectar y células infectadas con HCVpp sin evoltura, que proporcionaron una señal inferior al 3.5%. Se representan los valores medios y las desviaciones estándar de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

6.1. MUTANTES DE DELECCIÓN DE LOS PÉPTIDOS DE FUSIÓN DE E2₆₆₁

Los virus con envoltura, como el HCV, poseen una bicapa lipídica que rodea su nucleocápsida. Las glicoproteínas presentes en su envoltura están implicadas en la unión con los receptores celulares. Tras la unión, la entrada de estos virus en las células requiere la fusión de las membranas viral y celular mediante un proceso en el que también participan estas glicoproteínas.

En el caso del HCV se ha observado que los ectodominios de E1 y E2 juegan un papel fundamental en la unión del virus a sus receptores celulares, estando ambas proteínas implicadas en la fusión del virus con la membrana de la célula hospedadora (Bartosch y Cosset, 2006; Lavillette *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2006; Scarselli *et al.*, 2002). Sin embargo, la falta de estudios estructurales ha dificultado la determinación de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la fusión, así como la localización de los péptidos fusogénicos de las proteínas implicadas en este proceso.

El bloqueo del proceso de entrada del HCV constituiría una terapia bastante eficaz contra la hepatitis C puesto que conllevaría la supresión de la infectividad, de la replicación y de la citotoxicidad inducida por los contactos virus-célula. Así, la caracterización estructural de dichas proteínas, o bien, de fragmentos importantes en el proceso fusogénico, sería de gran ayuda. Pese a que no existen estudios que confirmen que la glicoproteína E2 sea la proteína de fusión del HCV, las analogías observadas en la organización de los genes que codifican las proteínas de la envoltura con otros virus de clase II (como flavivirus y alfavirus), sugieren que la proteína de fusión es la segunda glicoproteína en la poliproteína precursora y que ésta muestra un plegamiento de tipo II (Figura 84). Además, tanto la proteína E de flavivirus como la proteína E1 de alfavirus, cuyas estructuras tridimensionales son conocidas, muestran el mismo plegamiento a pesar de que sus secuencias no están conservadas, lo que sugiere que los genes que las codifican proceden de un ancestro común.

Por tanto, parece lógico pensar que E2 HCV podría ser la proteína responsable de la fusión entre las membranas virales y celulares. Con el fin de obtener información acerca de la localización de las regiones fusogénicas en E2, se procedió a eliminar diferentes regiones con tendencia a insertarse en la

membrana, que han sido descritas en estudios previos. Así, con base en estudios del perfil de hidrofobicidad de la proteína se observaron tres regiones capaces de integrarse en la membrana: residuos 430-449, 543-560 y 603-624 (Pacheco *et al.*, 2006). Cada una de estas tres regiones se eliminó por separado para ver su efecto aislado, y además se eliminaron las tres regiones simultáneamente, para ver su efecto conjunto en las propiedades fusogénicas del ectodominio de E2. Por otro lado, mediante analogías con las proteínas de fusión tipo II, y según la posible conexión entre los residuos de Cys de E2 (Krey *et al.*, 2010), se determinó la existencia de una región (residuos 502-520) candidata a ser el péptido fusogénico de E2, que también fue deletada para estudiar su importancia en la interacción de E2 con vesículas fosfolipídicas.

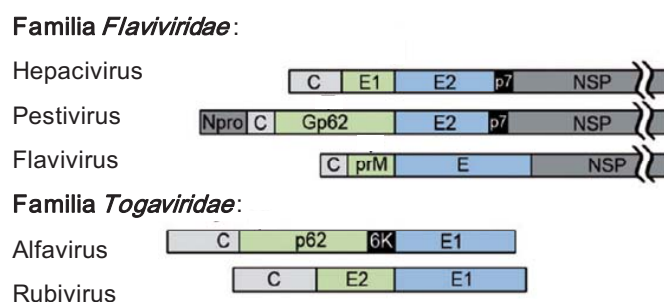


Figura 84. Organización de los genes que codifican las proteínas de la envoltura en algunos virus de clase II. Las proteínas no estructurales o NS aparecen en gris oscuro, y las proteínas integrales de membrana pequeñas en negro. La proteína de fusión aparece en azul claro y la proteína acompañante que actúa como chaperona en verde pálido. (Adaptada de Vaney y Krey, 2011).

Otros autores han identificado diferentes regiones de E1 y E2 que podrían estar implicadas en la fusión virus-célula hospedadora. Lavillette y col. (2007) propusieron las regiones 270-284 de E1 y 416-430 y 600-620 de E2; Pérez-Berná y col. (2006), la región de E1 265-296 y Russell y col. (2009) la región 262-290 de E1. Por lo tanto, no parece muy claro cuál de las dos glicoproteínas es la implicada en el proceso de fusión ni el mecanismo a través del cual se produce.

La expresión y purificación de una forma truncada de E2 (aminoácidos 384-661), en la que el dominio hidrofóbico carboxilo terminal fue eliminado por inhibir la secreción de la proteína en células de mamífero y de insecto (Nishihara *et al.*, 1993), fue llevada a cabo previamente en el sistema de expresión de baculovirus (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009). De esta forma se obtiene una proteína E2₆₆₁ correctamente plegada y con propiedades desestabilizantes de membranas (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007).

Dado el éxito obtenido al expresar el ectodominio de E2 en el sistema de baculovirus, se han producido los distintos mutantes de fusión de E2₆₆₁ con una secuencia de 6 His en el extremo amino terminal de todas las proteínas con el fin de facilitar su purificación. Para todos los mutantes de fusión se observó una elevada secreción de las proteínas al medio extracelular de los cultivos de las células de insecto. Además, en todos los casos, se detectó una única banda en condiciones reductoras mediante inmunodetección, siendo la masa molecular observada unos 15 kDa superior a la teórica, debido a la presencia de glicosilaciones. En cambio, las proteínas no secretadas al medio extracelular mostraron un tamaño más heterogéneo, pudiendo corresponder a proteínas con distintos grados de glicosilación que no se han plegado adecuadamente o incluso puede haber un cierto grado de degradación de las mismas.

Con el fin de conseguir la máxima secreción de proteína al medio extracelular, se monitorizó la expresión de proteína en el sobrenadante a distintos días de infección. Se observó que para todas las proteínas mutantes los niveles de expresión eran más elevados en el quinto día de infección. En cuanto a la multiplicidad de infección usada para producir las proteínas recombinantes se usó la misma que con E2₆₆₁, siendo ésta de 5 a 10.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de producción, se procedió a purificar las proteínas recombinantes en condiciones nativas y en un solo paso mediante cromatografía de afinidad, obteniéndose rendimientos de 5-20 mg de proteína por litro de cultivo. Estos rendimientos son superiores al obtenido para E2₆₆₁, que es de 5-6 mg de proteína por litro de cultivo (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009). En concreto, los mutantes de fusión E2_{Δ430}, E2_{Δ603} y E2_{TM} son los que se obtuvieron con mayor rendimiento, lo que puede deberse a la elevada hidrofobicidad de las regiones eliminadas. La pureza de las muestras,

determinada mediante PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie, fue muy alta en todos los mutantes.

Por tanto, se han obtenido todos los mutantes de fusión de E2₆₆₁ con un elevado grado de pureza y en gran cantidad, lo que ha permitido realizar su caracterización tanto estructural como funcional en cuanto a su capacidad para desestabilizar lípidos.

La eliminación de las posibles regiones fusogénicas de E2 podría tener consecuencias en el correcto plegamiento de la proteína. Por ello, se llevó a cabo la caracterización estructural de todos los mutantes tomando como referencia la proteína E2₆₆₁.

La caracterización espectroscópica de los mutantes de fusión mediante dicroísmo circular en el ultravioleta lejano indica que se trata de proteínas con un alto porcentaje de estructura no ordenada (~40%), siendo la estructura ordenada mayoritaria la de tipo extendido (~50%), y conteniendo un bajo porcentaje de estructura en hélice α (~10%), como es característico de las proteínas de fusión tipo II. Estos porcentajes se calcularon a partir de los espectros de dicroísmo utilizando el método CCA (*Convex Constraint Analysis*) (Perczel *et al.*, 1991) y resultaron ser similares a los porcentajes teóricos obtenidos mediante el método GOR IV de Garnier (Garnier *et al.*, 1996). Estos datos son muy similares a los obtenidos con E2₆₆₁, lo que pone de manifiesto que la estructura secundaria de cada uno de los mutantes no ha sufrido apenas modificaciones al eliminar las posibles regiones fusogénicas. El cálculo de la composición de estructura secundaria de una proteína también es posible mediante el empleo de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). De hecho, el dicroísmo circular es una técnica más fiable para el cálculo del porcentaje de hélice α de una proteína, mientras que la espectroscopía infrarroja es más fiable para el cálculo del porcentaje de estructura β . Así, mediante esta técnica en modo ATR, se obtuvieron porcentajes de estructura β del 32% para E2₆₆₁ y en torno al 30-40% para los mutantes de fusión a pH neutro. Un estudio reciente realizado con una proteína E2 (aminoácidos 384-715) genotipo 2b, producida en células de *Drosófila* S2, reveló un contenido en estructura β del 28% calculado mediante FTIR (Krey *et al.*, 2010), lo que está de acuerdo con los resultados

obtenidos. Los espectros de FTIR en modo ATR se realizaron también a pH 5.0, no observándose variaciones importantes en cuanto a los porcentajes de estructura secundaria en ninguna de las proteínas. Este resultado ya se obtuvo con el dicroísmo circular en el ultravioleta lejano para E2₆₆₁, en el que no se apreciaban variaciones importantes en la estructura secundaria de la proteína entre valores de pH comprendidos entre 3.0 y 11.0 (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007).

En los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo, sí se observaron ciertas variaciones con respecto al espectro de E2₆₆₁. El mutante E2_{Δ430} presenta un espectro muy similar al del ectodominio completo, con dos bandas dicroicas negativas, lo que demuestra que se trata de una proteína con una estructura terciaria no desnaturalizada. En cambio, los mutantes E2_{Δ543}, E2_{Δ603}, E2_{TM} y E2_{Δ502}, presentan variaciones en la posición de estas dos bandas dicroicas y en los valores de elipticidad. En el caso de los mutantes E2_{Δ543}, E2_{Δ603} y E2_{TM}, estas variaciones podrían ser debidas a la eliminación de varios residuos de Trp y/o de Tyr en las regiones que han sido delecionadas, como se muestra en la Figura 85. No obstante, las bandas dicroicas negativas obtenidas en los espectros ponen de manifiesto que todas estas proteínas mutantes se pliegan en una estructura bien definida. En cambio, en el caso de E2_{Δ502} no se ha eliminado ningún Trp, y la eliminación de la Tyr 510 no debería dar cuenta de una variación tan drástica en el espectro, por lo que parece que, en este caso, sí se ha producido un cambio en la estructura terciaria de la proteína al eliminar dicha región. La elipticidad que presentan las dos bandas dicroicas negativas obtenidas en el espectro de esta proteína es muy baja, lo que lleva a pensar que la estructura terciaria que presenta esta proteína no está bien definida. Cabe destacar que al delecionar la región 502 a 520 se ha eliminado un puente disulfuro formado por las Cys 503-508, que podría ser importante para el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína.

Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia indican que se trata de proteínas en las que los residuos de Trp se localizan, en general, en un entorno relativamente poco hidrofóbico, puesto que el máximo de emisión de fluorescencia está centrado en torno a 334 nm, siendo la contribución de los residuos de Tyr muy baja en todos los mutantes. En el caso de los mutantes

E2_{Δ430} y E2_{TM}, se observa un pequeño desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo (3 nm), lo que indicaría una mayor exposición de los residuos de Trp cuando se elimina la región 430-449. Con el resto de los mutantes de fusión no se ha observado desplazamientos en el valor del máximo de emisión de fluorescencia, por lo que según esta técnica no parece que se hayan producido variaciones importantes en el microentorno de los fluoróforos de la proteína.

```

375 ADPHHHHHE THVTGGTAAQ TTAGLVSLLS PGAQQDIQLI 414
415 NTNGSWHINS TALNCNDSLY TCWLAGLFYH HKFNSSGCPE 454
455 RFASCRPLTD FAQGWGPISH ANGSGPDQRP YCWHYPPKPC 494
495 GIVPAKSVCG PVYCFTPSPV VVGTTDRSGA PTYSWGANDT 534
535 DVFVLNNTRP PLGNWFGCTW MNSTGFTKVC GAPPCVIGGV 574
575 GNNTLHCPTD CFRKHPEATY SRCGSGPWIT PRCLVNYPYR 614
615 LWHYPCTINY TIFKVRMYVG GVEHRLEAAC NWTRGERCNL 654
655 EDRDRSE 661

```

Figura 85. Secuencia de aminoácidos de E2₆₆₁. En negrita se ha resaltado la secuencia de ADP y las 6 His. Las regiones eliminadas en los mutantes de fusión aparecen en gris. Se han marcado en azul los residuos de Trp, en rojo las Tyr y en verde las Cys.

Cuando se analizó el estado de oligomerización de las proteínas mutantes mediante PAGE-SDS, se observó que, en condiciones reductoras, migran como una única banda correspondiente a la forma monomérica, mientras que en condiciones no reductoras se diferencian al menos cuatro bandas que corresponden a los estados monomérico, dimérico, trimérico y tetramérico. Sólo se obtuvieron diferencias en el estado de oligomerización de E2_{Δ502} con respecto a E2₆₆₁, observándose que la mayor parte de las moléculas de E2_{Δ502} se asocian formando oligómeros de tres o más unidades, lo que corroboraría el plegamiento alterado de esta proteína observado en los espectros de dicroísmo circular en el UV próximo.

Mediante el análisis del reconocimiento de estas proteínas por anticuerpos de sueros de pacientes infectados por el HCV, se observó que el mutante E2_{Δ430} presentaba una mayor capacidad antigénica con respecto a E2₆₆₁, lo que indicaría una mayor exposición de los epítomos reconocidos por

dichos anticuerpos, coincidiendo con los datos obtenidos a partir de los espectros de fluorescencia. En cambio, en los otros mutantes, hay una gran disminución de la capacidad antigénica hasta llegar a ser nula en el caso de E2 Δ 543, E2 Δ TM y E2 Δ 502. Estos resultados podrían deberse a la eliminación de epítomos reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes infectados por el HCV, bien como consecuencia directa de la delección de residuos clave en la constitución de los epítomos, y/o bien por cambios locales que hayan podido afectar a la conformación de los epítomos.

La realización de enzimoimmunoensayos con el anticuerpo conformacional H53, que reconoce a la proteína E2 del HCV cuando está correctamente plegada (Cocquerel *et al.*, 1998), permitió comprobar si el plegamiento de las proteínas era el adecuado. Los mutantes E2 Δ 543 y E2 Δ 502 no son reconocidos por este anticuerpo, mientras que los mutantes E2 Δ 603 y E2 Δ TM lo son débilmente. En el caso del mutante E2 Δ 430 el reconocimiento por este anticuerpo es muy similar al de E2 Δ 661, aunque ligeramente superior. En un estudio realizado empleando HCVpp en las que se sustituyen algunos residuos de las glicoproteínas por residuos de Ala, se ha observado que mutaciones introducidas entre los residuos 540 y 550 de E2 presentan un reconocimiento reducido por este anticuerpo (Owsianka *et al.*, 2006), lo que explicaría el nulo reconocimiento del mutante E2 Δ 543 por H53, y la baja reactividad observada con E2 Δ TM. El hecho de que en este último mutante, que carece también de la región 543-560, sea reconocido, aunque débilmente, por H53, junto con la observación de un pequeño aumento en el reconocimiento de E2 Δ 430 con respecto a E2 Δ 661, indicaría que la eliminación de los residuos 430-449 podría provocar una mayor exposición de otra región en la proteína que también sería reconocida por dicho anticuerpo. En el caso de E2 Δ 502, en cambio, la nula reactividad con este anticuerpo podría indicar la importancia de esta región en el plegamiento de la proteína, ya que parece haber perdido la conformación tridimensional que presenta E2 Δ 661, como también se ha observado en el espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo y en el análisis de su estado de agregación. En el caso de E2 Δ 603, el bajo reconocimiento por H53 puede deberse a un cambio en la conformación con respecto al ectodominio completo, o debido a la participación de esta región en el epítomo conformacional reconocido por H53.

En conclusión, los mutantes de fusión obtenidos no presentan variaciones en la estructura secundaria con respecto a E2₆₆₁. Los mutantes E2_{Δ430}, E2_{Δ543}, E2_{Δ603} y E2_{TM} presentan una pequeña variación en su conformación con respecto a E2₆₆₁ debido a la eliminación de las regiones fusogénicas, aunque siguen siendo proteínas con una estructura tridimensional definida. En cambio, el mutante E2_{Δ502} parece haber perdido la estructura terciaria original de E2₆₆₁, y presenta un alto grado de agregación. Por esta razón, la caracterización funcional de este mutante no se ha llevado a cabo.

Con los mutantes de fusión obtenidos se llevaron a cabo distintos estudios de interacción y desestabilización de bicapas utilizando sistemas modelo de membrana, y más concretamente con vesículas de fosfolípidos ácidos, dada la baja capacidad que presenta la proteína E2₆₆₁ para interaccionar con fosfolípidos neutros (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007). Además, al ser la interacción de E2 con fosfolípidos ácidos independiente de la naturaleza de la cabeza polar, todos los ensayos se llevaron a cabo con vesículas de PG.

Los resultados obtenidos indican que todos los mutantes de fusión son capaces de interaccionar con vesículas de PG, provocando la agregación de las mismas de una manera dependiente de la concentración de proteína, tal y como se deduce del aumento de la densidad óptica a 360 nm, siendo este efecto más acusado a pH 5.0 que a pH 7.0. Los resultados que se obtuvieron a pH 7.0 no fueron repetitivos en ningún caso, y por ello no han sido mostrados, aunque a este pH se forman agregados de menor tamaño a juzgar por los menores valores de DO observados. En cambio a pH 5.0, los resultados sí fueron repetitivos y se pudieron evaluar las diferencias obtenidas en la capacidad de inducir agregación de vesículas de los mutantes con respecto al ectodominio de E2 completo. A la máxima concentración de proteína empleada, 3.5 μM, los mutantes E2_{Δ430} y E2_{Δ543} inducen alrededor de un 10% menos de agregación que E2₆₆₁, mientras que E2_{Δ603} y E2_{TM} inducen un 25 y un 37% menos de agregación, respectivamente, en comparación con el ectodominio completo. Estos datos indican que, al eliminar las regiones fusogénicas, los agregados formados resultan ser de menor tamaño, siendo el efecto de la eliminación de la región

603-624 el que origina los agregados más pequeños. Es más, parece que el efecto de la eliminación de estas regiones fusogénicas es acumulativo, ya que con el triple mutante, los agregados formados son aún más pequeños que con cualquiera de los mutantes sencillos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de mezcla de lípidos indican que los agregados de vesículas de PG inducidos por las proteínas mutantes acaban fusionando completamente, en el caso de los mutantes de fusión sencillos, y parcialmente en el caso de E2_{TM} a pH 5.0.

Por otro lado, los ensayos de liberación de contenidos acuosos de vesículas de PG a pH 5.0, indican que todos los mutantes de fusión son capaces de provocar la lisis de las vesículas, comportándose de manera análoga a E2₆₆₁ e indicando que las regiones delecionadas no intervienen en este proceso.

De los tres estudios de desestabilización de vesículas lipídicas llevados a cabo (agregación, mezcla de lípidos y liberación de contenidos acuosos) se puede deducir que es la eliminación conjunta de las tres regiones fusogénicas la que tendría un efecto más o menos importante en las propiedades fusogénicas de E2₆₆₁, puesto que en líneas generales la delección individual de cada región afecta muy débilmente a la capacidad fusogénica de E2₆₆₁. Aún así, el efecto producido por la eliminación de las tres regiones no produce una pérdida total de la capacidad fusogénica de la proteína, sino únicamente parcial.

No es la primera vez que se propone la actuación conjunta de varias regiones en el proceso de fusión, ya que estudios previos han descrito la posible implicación de varias regiones de E1 y E2 en la fusión de las membranas, estando implicadas dichas regiones directa o indirectamente en este proceso (Lavillette *et al.*, 2007). También en otros virus con envoltura ha sido descrita la actuación conjunta de varias regiones de la proteína fusogénica en la fusión de las membranas (Peisajovich *et al.*, 2003). Además, tanto la glicoproteína G de virus de la estomatitis vesicular. Como la glicoproteína gB del virus del herpes simple, presentan un péptido fusogénico constituido por dos lazos (Heldwein *et al.*, 2006; Roche *et al.*, 2006).

El modo de interacción de los diferentes mutantes de E2 con las bicapas lipídicas se ha estudiado mediante dos técnicas espectroscópicas: polarización de fluorescencia y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

En cuanto a los estudios de polarización de fluorescencia, sólo se realizaron con el triple mutante de E2 a pH 5.0. Los resultados mostraron que E2_{TM} producía el mismo efecto que E2₆₆₁ en la transición de fase de DMPG, es decir, una disminución en la amplitud de la transición, siendo este efecto más acusado por encima de la T_m, y un pequeño aumento en la T_m. Además, los resultados obtenidos fueron similares con las sondas hidrofóbicas DPH (que se inserta en el interior de la bicapa lipídica) y TMA-DPH (que se localiza interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos). Un aumento en la T_m es indicativo de una interacción superficial a nivel de la cabeza polar, típica de una proteína periférica. Por el contrario, una disminución de la amplitud de la transición, existiendo una fase más ordenada por encima de la temperatura de transición y un estado menos ordenado por debajo de la temperatura de transición, es característico de proteínas integrales que se insertan modificando la zona más hidrofóbica de la bicapa. Por tanto, E2_{TM} sigue estando integrada en la membrana a pH 5.0, a pesar de haber delecionado tres posibles regiones fusogénicas en E2.

Con respecto a la espectroscopía FTIR, esta técnica permite el estudio simultáneo de la estructura de lípidos y proteínas sin la necesidad de introducir sondas externas. Se estudió la estructura de los mutantes de fusión en presencia de vesículas de DMPG a pH 7.0 y 5.0. El cálculo de los espectros de diferencia de la proteína en presencia y ausencia de vesículas, a ambos valores de pH, permitió observar la aparición de una estructura en hélice α en las proteínas E2₆₆₁, E2 _{Δ 430} y E2 _{Δ 543} que representa el 10% de la proteína (unos 30 aminoácidos) y que sólo se produce a pH 5.0. Además, al eliminar la región de aminoácidos 603 a 624, tanto en el mutante E2 _{Δ 603} como en E2_{TM}, se anula el efecto producido por la interacción con las vesículas de DMPG, lo que podría sugerir que dicho péptido es el que adopta la estructura helicoidal al interaccionar con las vesículas. Aún así, los valores de los porcentajes de estructura secundaria calculados mediante el método de autodeconvolución de Fourier no reflejaron dicho efecto, obteniéndose un aumento en el contenido en

hélice α para todas las proteínas a ambos valores de pH, lo que reflejaría las limitaciones de esta técnica para el cálculo de este componente de estructura secundaria, como ya se ha comentado anteriormente. Mediante esta técnica también fue posible calcular el ángulo de orientación de las proteínas y de sus hélices α en la membrana cuando se obtienen los espectros en presencia de polarizadores a 90° y 0° . De este modo, se observó que tanto E2₆₆₁ como sus mutantes de fusión están integrados en la membrana a pH 7.0 y 5.0, existiendo una pequeña variación en el ángulo (5°) a pH 5.0 para E2₆₆₁, E2 _{Δ 430} y E2 _{Δ 543}, a favor del plano de la membrana, mientras que esta variación no se produce en el caso de E2 _{Δ 603} y E2_{TM}. Cuando se calculó el ángulo de orientación de la hélice α en la membrana, se observó que ésta se encuentra integrada en la membrana a ambos valores de pH, aunque la variación del ángulo es más acusada cuando se cambia el pH de 7.0 a 5.0 con E2₆₆₁, E2 _{Δ 430} y E2 _{Δ 543} (entre 5° y 15°), sin que varíe con E2 _{Δ 603} y E2_{TM}. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los espectros de diferencia, y confirman que todos los mutantes se integran en la membrana, tal y como se observó en los experimentos de polarización de fluorescencia.

Coincidiendo con los resultados obtenidos, la implicación de la región 600-620 de E2 en la fusión también ha sido descrita por Lavillette y col. (2007) empleando el sistema de HCVpp, lo que parece indicar que esta región es importante en el proceso de fusión.

Por último, y dado que existen evidencias experimentales que demuestran que es necesaria la presencia conjunta de E1 y E2 para obtener la máxima actividad fusogénica (Takikawa *et al.*, 2000), se analizó también el efecto de la presencia del ectodominio de E1 en las propiedades fusogénicas de E2. Estudios previos demostraron buenos resultados al producir proteínas quiméricas basadas en los ectodominios de E1 y E2 (E1₃₄₀E2₆₆₁) en el sistema de expresión de baculovirus (Tello *et al.*, 2010). Además, el rendimiento de purificación aumentaba considerablemente al permutar la posición de ambos ectodominios (E2₆₆₁E1₃₄₀ o E2E1), sin que resultaran alteradas sus propiedades estructurales ni funcionales en cuanto a su interacción con vesículas fosfolípicas (Tello D. Tesis Doctoral, 2008). Por ello, se decidió realizar la

construcción E2_{TM}E1, al ser E2_{TM} el único mutante de fusión con el que se ha obtenido una menor capacidad fusogénica con respecto a E2. Ambos ectodominios se encuentran unidos por una secuencia espaciadora flexible de 21 aminoácidos.

De la misma forma que con los mutantes de fusión anteriores, se llevó a cabo la producción de la proteína E2_{TM}E1 en el sistema de expresión de baculovirus, observándose una alta secreción al medio extracelular de las células de insecto, que es máxima entre el cuarto y el quinto día de infección. Su purificación permitió obtener unos 7 mg de proteína por litro de cultivo con una elevada pureza, rendimiento muy similar al obtenido con E2E1 (Tello D. Tesis Doctoral, 2008). La masa molecular experimental de la proteína es unos 20 kDa mayor que la teórica debido a que se encuentra altamente glicosilada.

La caracterización estructural de este mutante se ha realizado tomando como referencia la proteína E2E1. Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano indicaron que la estructura secundaria de ambas proteínas es muy similar. Se trata de proteínas con un elevado contenido en estructura aperiódica, siendo la de tipo β la estructura ordenada mayoritaria. En cuanto al microentorno de los fluoróforos de E2_{TM}E1, los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos con el mutante y E2E1 resultaron ser prácticamente idénticos, mostrando un máximo centrado en torno a los 333 nm, indicativo de que los Trp de la proteína se encuentran en un microentorno relativamente poco hidrofóbico. Además, la contribución de los residuos de tirosina es muy baja en ambas proteínas. Estos resultados indican que la eliminación de las posibles regiones fusogénicas en E2 no altera ni la estructura secundaria ni el microentorno en el que se encuentran los fluoróforos de la proteína quimérica completa. Asimismo, el análisis del estado de oligomerización de E2_{TM}E1, reveló que al igual que E2E1, el mutante migra al menos en forma de monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros, siendo muy baja la proporción de monómero en ambas proteínas.

El mutante E2_{TM}E1 presentó una menor capacidad antigénica con respecto a E2E1, pero esta capacidad es superior a la de E2_{TM}, lo que sugiere que E1 es reconocida también por los anticuerpos presentes en el suero. Además, el reconocimiento del mutante E2_{TM}E1 por el anticuerpo H53 fue muy bajo, al igual que se observó con E2_{TM}.

Los estudios estructurales realizados con E2_{TM}E1 muestran, por tanto, que no se han producido variaciones estructurales importantes con respecto a E2E1, por lo que se procedió a estudiar la capacidad de dicho mutante para interactuar con vesículas de PG.

E2_{TM}E1 fue capaz de interactuar con vesículas de PG a pH 5.0 produciendo la agregación de las mismas. A la mayor concentración de proteína utilizada (2 μ M), no se obtuvieron diferencias en cuanto a su capacidad de inducir agregación de vesículas con respecto a E2E1, mientras que el mutante E2_{TM} indujo un 20% menos de agregación que E2₆₆₁. El hecho de que se alcance el mismo valor de DO₃₆₀ a una concentración de proteína 2 μ M, tanto con E2 como con E2E1 y E2_{TM}E1, podría indicar un posible efecto de E1 en el proceso de agregación, que actuaría compensando la disminución en la agregación producida por la eliminación de las regiones fusogénicas de E2.

Los ensayos de mezcla de lípidos indican que los agregados de vesículas de PG inducidos por la proteína E2_{TM}E1 acaban fusionando parcialmente a pH 5.0, de la misma manera que se obtuvo con E2_{TM}, mientras que con E2E1 la fusión es total. A pH 7.0 los resultados obtenidos con las construcciones basadas en E2 no fueron repetitivos, observándose que son capaces de inducir fusión de vesículas aunque este efecto es menor que a pH 5.0. En cambio, en el caso de E2E1 y E2_{TM}E1 a pH 7.0 sí se obtuvieron resultados repetitivos, observándose que ambas proteínas se comportan de modo muy similar, y no son capaces de inducir fusión de vesículas. Este resultado indica que E1 podría actuar como modulador de la función de E2, probablemente enmascarando los péptidos de fusión de la proteína a pH 7.0. A pH ácido, se produciría la disociación del complejo E1E2 que daría lugar a la exposición de los péptidos fusogénicos de E2, posibilitando la fusión. Esta observación está de acuerdo con la hipótesis de que los ectodominios deben disociarse a pH ácido (Op de Beek *et al.*, 2004) para tener actividad fusogénica, de tal manera que la disociación del complejo E1E2 implicaría la exposición de los posibles péptidos fusogénicos de E2. Este proceso de separación de la proteína acompañante se ha descrito en alfavirus como una etapa de regulación imprescindible, sin la cual los virus no dan lugar al proceso de fusión, disminuyendo la infectividad (Salminen *et al.*, 1992; Stadler *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003).

Los ensayos de liberación de contenidos acuosos de vesículas de PG a pH 5.0, dan como resultado que E2E1 y E2_{TM}E1 inducen un 95% de F_{\max} a una concentración de proteína de 0.6 μM , mientras que E2₆₆₁ y sus mutantes de fusión inducen un 70% de F_{\max} a concentraciones de proteína entre 1.2 y 2 μM . Estos resultados sugieren la participación de E1 en el proceso de liberación del contenido acuoso de las vesículas. El hecho de que, a la concentración de proteína a la que la lisis de las vesículas es máxima, su capacidad de inducir agregación y mezcla de lípidos sea baja, indica que no es necesaria la fusión de las vesículas para que se produzca la liberación del contenido acuoso. Este resultado fue observado también en el caso del péptido fusogénico amino terminal del HIV (Nir y Nieva, 2000).

Los estudios de polarización de fluorescencia realizados con E2_{TM}E1 a pH 5.0, mostraron el mismo efecto que E2E1 en la transición de fase de DMPG empleando las sondas fluorescentes DPH y TMA-DPH: un pequeño aumento en la T_m y una disminución en la amplitud de la transición de fase del lípido, siendo este efecto más acusado por encima de la T_m , lo que es característico de proteínas integrales de membrana. La presencia de E1 en este estudio no introduce variaciones con respecto al comportamiento de E2.

Una consideración importante a tener en cuenta en el proceso de fusión es el hecho de que estos estudios se han realizado con el ectodominio de E2 truncado en el residuo 661, sin la región *stem* (residuos 652-715) que conecta el dominio DIII con la región transmembrana. En proteínas de fusión tipo II de flavivirus, se ha propuesto que esta región interacciona con otra próxima al péptido fusogénico, estabilizando la conformación en horquilla producida tras la fusión (Harrison, 2008; Kielian y Rey, 2006). Drummer y Pombourios (2004) demostraron que los residuos conservados en la zona con repeticiones de 7 aminoácidos presente en la región *stem* eran esenciales para la entrada del HCV, y propusieron que esta región de E2 es funcionalmente homóloga a la región *stem* de la glicoproteína E de flavivirus. Un estudio reciente en el que se realizaron inserciones de 5 aminoácidos en distintas regiones de E1E2 en el sistema de HCVpp, reveló que el mutante con una inserción en la región 682 no mostraba actividad fusogénica, sin que resultasen afectadas otras funciones

(Rychlowska *et al.*, 2011). Todos estos datos corroboran la importancia de la región *stem* en el proceso de fusión, por lo que en el futuro podría ser interesante la producción recombinante de la proteína E2₇₁₅ comprendiendo los residuos 384 a 715.

Otro factor más a considerar es que *in vivo* puede ser necesaria la presencia de receptores celulares, ausentes en estos estudios *in vitro* para que se produzca el proceso de fusión. De hecho, se ha descrito la importancia de la interacción de E1E2 con el receptor celular CD81 en la fusión, ya que parece ser que la interacción con CD81 prepara a las glicoproteínas del HCV para la fusión a pH ácido, induciendo cambios conformacionales en las mismas (Sharma *et al.*, 2011).

Combinando los datos obtenidos en los experimentos de interacción con lípidos realizados con los obtenidos para las proteínas de fusión tipo II, podría proponerse un modelo para explicar el mecanismo de fusión del HCV con las células diana (Figura 86). La mayoría de los estudios realizados señalan que la unidad funcional de la envoltura de la partícula viral la constituye el heterodímero no covalente E1E2. Una característica común de las proteínas de fusión tipo II es que se orientan paralelamente a la membrana. Una vez endocitado, el HCV sería transportado a los endosomas, donde el pH ácido de este compartimento provocaría la disociación del heterodímero E1E2, dando lugar a la exposición de los péptidos fusogénicos de E2 y a la reorientación de E2 perpendicularmente a la membrana. Las interacciones electrostáticas contribuirían a la aproximación entre las membranas virales y celulares y los péptidos fusogénicos se insertarían en la membrana del endosoma. De manera similar a otras proteínas de fusión tipo II de alfa y flavivirus, en las que se ha observado que la estructura post-fusión consiste en la reorganización de los dímeros a homotrímeros (Bressanelli *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2004; Modis *et al.*, 2004), la proteína E2 del HCV podría formar trímeros, que adoptarían una estructura en horquilla y darían lugar a la fusión entre las membranas virales y celulares.

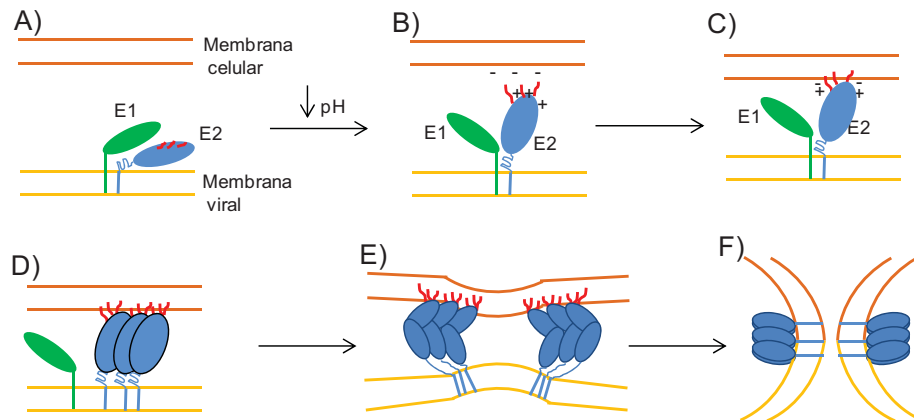


Figura 86. Modelo propuesto para el mecanismo de fusión del HCV. A) E1 y E2 forman un heterodímero no covalente en la superficie viral. E1 actúa como proteína acompañante, impidiendo la exposición de los péptidos de fusión de E2. B) El pH ácido del endosoma provoca la disociación del heterodímero dando lugar a la exposición de los péptidos fusogénicos de E2 (en rojo). C) Las interacciones electrostáticas entre las regiones con carga positiva de E2 y los fosfolípidos ácidos de la membrana celular, dan lugar a la aproximación de las membranas viral y celular, permitiendo la inserción de los péptidos de fusión de E2 en la membrana celular. D) E2 podría asociarse formando homotrímeros. E) Los homotrímeros adoptarían una conformación en horquilla con la posible participación de la región *stem* (región que une el ectodominio con el dominio transmembrana) (Drummer y Pountourios, 2004). F) Se produce la fusión de las membranas viral y celular gracias a los cambios conformacionales experimentados por E2, quedando las regiones fusogénicas en el mismo lado que los dominios transmembrana de la proteína, y a la actuación cooperativa de varios heterotrímeros.

6.2. IMPLICACIÓN DE LA CYS 652 EN EL ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN DE E2₆₆₁

Debido a la tendencia a agregar que presenta la proteína E2₆₆₁ mediante interacciones covalentes, y gracias a la información obtenida en estudios recientes acerca del patrón de puentes disulfuro de la misma (Krey *et al.*, 2010; Whidby *et al.*, 2009) se observó que en el ectodominio de E2 empleado en nuestros estudios, el enlace disulfuro existente entre las Cys 652 y 677 no existiría, ya que esta proteína está truncada en el residuo 661. Por tanto, la Cys 652 se encontraría libre en el ectodominio de E2 pudiendo dar lugar a la formación de puentes disulfuro intermoleculares, y contribuyendo a la agregación de la proteína en solución. Además, la presencia de estos agregados podría

tener consecuencias en la función de la proteína. Por todos estos motivos se sustituyó la Cys 652 por una Ser en la proteína E2₆₆₁ y se estudió el efecto de dicha mutación tanto en su estructura como en su función.

De manera análoga a los mutantes de fusión, la expresión de la proteína E2_{C652S} se realizó en el sistema de baculovirus y se añadió una secuencia de 6 His en el extremo amino terminal de la proteína con el fin de facilitar su purificación. La secreción de la proteína al medio extracelular resultó ser muy elevada, y al igual que E2₆₆₁, es máxima en el quinto día de infección. La purificación se realizó en las mismas condiciones usadas para los mutantes de fusión, obteniéndose una proteína con una elevada pureza y con un rendimiento de unos 12 mg por litro de cultivo, el doble con respecto a E2₆₆₁. Es posible que el alto rendimiento en el aislamiento de E2_{C652S} esté relacionado con la menor tendencia a oligomerizar que presenta esta proteína. Nuevamente, se obtuvo una proteína con una masa molecular unos 15 kDa superior a la teórica, debido a la presencia de glicosilaciones.

El análisis del estado de oligomerización de E2_{C652S} mediante PAGE-SDS en condiciones no reductoras mostró que la proteína migraba en forma de cuatro bandas correspondientes a las formas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica, como ocurre con E2₆₆₁, aunque la proporción de la forma monomérica fue muy superior a la obtenida con E2₆₆₁. Por otro lado, los resultados obtenidos en los experimentos de velocidad de sedimentación en condiciones nativas mediante ultracentrifugación analítica, mostraron que la proporción de monómero en E2_{C652S} era aproximadamente el doble que en E2₆₆₁. La especie mayoritaria en el caso de E2₆₆₁ resultó ser el dímero, mientras que E2_{C652S} resultó ser mayoritariamente monomérica, en consonancia con los resultados obtenidos mediante PAGE-SDS en condiciones no reductoras. Estos datos corresponden a los experimentos llevados a cabo a pH 7.0. Teniendo en cuenta que a pH ácido se producen variaciones en la estructura cuaternaria de la proteína E2₆₆₁ (Rodríguez, M., Tesis Doctoral, 2007), estos experimentos se realizaron también a pH 5.0, observándose un aumento de la proporción de monómero para ambas proteínas, siendo estas formas monoméricas las

mayoritarias en las dos. Por tanto, a pH ácido se produce una disociación de las formas oligoméricas a monómeros, manteniéndose la diferencia en la proporción de monómero entre ambas proteínas. Estos resultados confirman, por tanto, la implicación de la Cys 652 de E2₆₆₁ en la oligomerización de la proteína mediante la formación de puentes disulfuro intermoleculares.

La caracterización espectroscópica de E2_{C652S} mediante dicroísmo circular en el UV lejano indicó que no existen variaciones en la estructura secundaria al sustituir la Cys 652 por una Ser en E2₆₆₁. Este resultado se corroboró mediante espectroscopía FTIR en modo ATR. Estos espectros se realizaron también a pH 5.0, no observándose variaciones importantes en cuanto a los porcentajes de estructura secundaria a ambos valores de pH, al igual que se obtuvo con E2₆₆₁.

En los espectros de dicroísmo circular en el UV próximo, aparecen dos bandas dicroicas negativas, indicando el entorno asimétrico en el que se encuentran los cromóforos de la proteína. Además, los espectros de E2_{C652S} y E2₆₆₁ son muy similares, no apreciándose ningún cambio en la conformación del mutante con respecto a la proteína salvaje. El espectro de emisión de fluorescencia indica que los Trp de la proteína E2_{C652S} se encuentran en un entorno relativamente poco hidrofóbico, mostrando un máximo de emisión centrado en torno a 335 nm, lo que indicaría que no se han producido variaciones en el microentorno de los fluoróforos de la proteína.

La capacidad para reconocer los anticuerpos presentes en el suero de pacientes infectados por el HCV por parte del mutante E2_{C652S} confirmó la adecuada conformación de la proteína. La obtención de señales similares respecto a la proteína salvaje demostró que la presencia de una mayor proporción de monómero en el mutante no produce modificaciones significativas en cuanto a su capacidad antigénica, y por tanto, los epítomos reconocidos por los anticuerpos del suero de los pacientes no se ven enmascarados por la presencia de agregados. El reconocimiento de E2_{C652S} por el anticuerpo conformacional H53 fue muy similar al de E2₆₆₁, confirmando que no existen variaciones en la conformación de la proteína.

En vista de estos resultados se puede afirmar que la sustitución Cys652Ser en E2₆₆₁ no implica ninguna modificación estructural y que la Cys 652 puede estar implicada en la formación de puentes disulfuro intermoleculares que favorecen la agregación de la proteína en solución.

Con el fin de comprobar si la presencia de agregados afecta a la capacidad de interacción y desestabilización de vesículas fosfolipídicas de E2₆₆₁, se realizaron ensayos de interacción lípido-proteína con el mutante E2_{C652S}. De la misma manera que con los mutantes de fusión de E2, estos ensayos se realizaron con vesículas de PG a pH 5.0.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la presencia de agregados no afecta a la funcionalidad de la proteína E2₆₆₁ en cuanto a su capacidad para interaccionar y desestabilizar vesículas de fosfolípidos. La única diferencia observada en el comportamiento de ambas proteínas ha sido que, en los ensayos de agregación con vesículas de PG a pH 5.0, E2_{C652S} induce un 25% menos de agregación que E2₆₆₁ a la mayor concentración de proteína empleada (3.5 μ M), lo que implica la formación de agregados de menor tamaño. Este resultado indicaría que la presencia de una mayor proporción de oligómeros en la proteína E2₆₆₁ podría favorecer la agregación de vesículas de PG a pH 5.0. En los ensayos de mezcla de lípidos y de liberación de contenidos acuosos se observó un comportamiento análogo del mutante E2_{C652S} con respecto a la proteína salvaje. Así, E2_{C652S} provoca que los agregados de vesículas de PG acaben fusionando completamente a pH 5.0 a una concentración de proteína de 3.5 μ M, y que se produzca la lisis de las mismas tras la adición de la proteína, llegando a un 75% de F_{max} a una concentración de proteína entre 1.2 y 2 μ M.

Los estudios de polarización de fluorescencia permitieron observar que el efecto de E2_{C652S} en la transición de fase de DMPG a pH 5.0 es el mismo que el observado con E2₆₆₁: la amplitud de la transición disminuye, siendo este efecto más acusado a temperaturas por encima de la T_m , y la T_m experimenta un pequeño aumento. Además, se obtuvieron resultados similares con las sondas DPH y TMA-DPH, aunque algo más acusados con DPH. Este efecto es característico de proteínas integrales de membrana.

Por último, mediante espectroscopía FTIR-ATR, se obtuvieron los espectros de E2_{C652S} en presencia y ausencia de vesículas de DMPG a pH 7.0 y 5.0. El cálculo de los espectros de diferencia a ambos valores de pH permitió observar la aparición de una estructura en hélice α que representa el 10% de la proteína a pH 5.0, al igual que ocurre con E2₆₆₁. Nuevamente, los valores de los porcentajes de estructura secundaria calculados mediante el método de autodeconvolución de Fourier no reflejaron dicho efecto, obteniéndose un aumento en el contenido en hélice α a ambos valores de pH. Sin embargo, el valor del ángulo de orientación de la proteína y de su componente en hélice α en la membrana pusieron de manifiesto que la proteína se encuentra integrada en la membrana a ambos valores de pH, observándose una pequeña variación en el ángulo (5-10°) a pH 5.0 a favor del plano de la membrana, lo que coincide con los datos obtenidos con E2₆₆₁ y en los ensayos de polarización de fluorescencia.

Por tanto, la sustitución de la Cys 652 por una Ser en E2₆₆₁ ha permitido obtener una proteína con una estructura y una capacidad de interaccionar con lípidos equivalentes a E2₆₆₁, pero con un contenido en monómero muy superior a E2₆₆₁. Precisamente este alto contenido en monómero, junto con el alto rendimiento de purificación obtenido para el mutante, fue aprovechado para intentar concentrar la proteína con el fin de poder cristalizarla. Ya se ha comentado anteriormente la falta de datos estructurales de las proteínas de la envoltura del HCV, lo que ha dificultado el estudio de los mecanismos moleculares que dan lugar a la entrada y fusión del virus con las células diana, y al diseño de vacunas eficaces contra el HCV. Por ello, la elucidación de la estructura tridimensional de las proteínas de la envoltura del HCV sería de gran utilidad. Con este fin, se logró concentrar la proteína hasta 15 mg/ml empleando un sistema de concentración por filtración y se llevaron a cabo varios intentos de cristalización que fueron infructuosos, debido, entre otros posibles factores, a la elevada glicosilación de la proteína, ya que las glicosilaciones introducen una mayor heterogeneidad química y conformacional que dificultan la cristalización. Ya que E2_{C652S} puede ser un buen candidato para determinar la estructura tridimensional detallada del ectodominio de E2 mediante difracción de rayos X,

en experimentos futuros sería interesante intentar llevar a cabo la desglicosilación de este mutante.

6.3. EFECTO DE E1 EN EL PLEGAMIENTO DE E2

Una de las características que presentan las proteínas de fusión tipo II es que se pliegan como un heterodímero con la glicoproteína que la precede en la poliproteína precursora. La primera proteína en el tándem actúa como chaperona para el plegamiento de la segunda, que es la proteína de fusión. Así, se ha demostrado que las glicoproteínas prM de Flavivirus (Lorenz *et al.*, 2002) y p62 de alfavirus (Andersson *et al.*, 1997), que preceden en la poliproteína precursora a las proteínas de fusión E y E1, respectivamente, funcionan como chaperonas para el plegamiento de estos polipéptidos (Figura 84). Además, las proteínas p62 y prM adoptan su estructura nativa únicamente en presencia de su respectiva proteína de fusión. Un comportamiento similar también ha sido observado en el caso del HCV, siendo el plegamiento de E2 dependiente de la coexpresión de E1 (Cocquerel *et al.*, 2003; Brazzoli *et al.*, 2005), así como el plegamiento de E1 es dependiente de la coexpresión de E2 (Michalak *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2001).

Para comprobar esta hipótesis y observar la influencia de E1 en el plegamiento de E2, se realizó una construcción formada por la glicoproteína E1 completa con su región transmembrana seguida del ectodominio de E2 (construcción E1tmbE2), con el fin de conseguir la secreción de la proteína E2₆₆₁ al medio de cultivo de las células de insecto Tni, tras su plegamiento en presencia de E1. Esta construcción se obtuvo basándonos en un estudio previo con una construcción similar; la expresión de la misma en células S2 de *Drosófila* permitió obtener la proteína E2 en el sobrenadante correctamente procesada y con la capacidad para inhibir la infección por HCVcc (Krey *et al.*, 2010). En nuestro caso, la construcción realizada presenta dos secuencias de 6 His en los extremos amino terminales de ambas proteínas con el fin de facilitar su purificación. Para evitar que la introducción de la secuencia de 6 His entre E1 y E2 alterase el correcto procesamiento entre los residuos 383 de E1 y 384 de E2 por las proteasas celulares, se incluyeron los primeros 4 aminoácidos de E2

antes de la secuencia de 6 His de su extremo amino terminal. Esta construcción fue expresada en baculovirus, y mediante inmunodetección se comprobó que el ectodominio de E2 (E2_{661p}) era secretado al medio extracelular, mientras que en el interior celular se observó una gran cantidad de bandas con tamaños muy heterogéneos, pudiendo corresponder a E1, a E2 o a complejos E1E2, con distintos grados de glicosilación, que no se han plegado adecuadamente o incluso con un cierto grado de degradación. La cantidad de proteína secretada resultó no ser muy elevada, lo que sugiere, junto con la heterogeneidad en el tamaño de proteínas obtenidas en el interior celular, que el procesamiento entre E1 y E2 no es tan eficaz como el procesamiento que tiene lugar tras el péptido señal gp67 que precede al resto de construcciones usadas en el sistema de baculovirus. Además, la secreción de proteína resultó ser óptima al cuarto día de infección, mientras que con el resto de proteínas obtenidas previamente, incluyendo E2₆₆₁, la secreción fue óptima en el quinto día. Este hecho podría explicarse por el distinto procesamiento de esta proteína respecto al resto, ya que las proteasas encargadas de realizar el corte proteolítico entre E1 y E2 y entre gp67 y E2 serían distintas. Aunque también podría ser debido a que E1 actuase, tal y como se ha propuesto, como chaperona en el plegamiento de E2, acelerando el plegamiento de la misma, y por tanto, obteniendo la máxima secreción de proteína en un tiempo menor. La purificación mediante cromatografía de afinidad permitió obtener una proteína con un grado de pureza elevado y un tamaño muy similar al de E2₆₆₁, lo que supone que ambas deben tener un patrón de glicosilación muy parecido. El rendimiento de la purificación resultó ser muy bajo, de 1 mg por litro de cultivo, debido a que una gran parte de la proteína no es secretada al medio extracelular por el ineficaz procesamiento catalítico de E1tmbE2. La máxima concentración que se consiguió obtener (80 µg/ml) no ha permitido realizar una caracterización estructural y funcional exhaustiva de la misma. En cualquier caso, la determinación del extremo amino terminal de la proteína purificada permitió comprobar su correcto procesamiento por las proteasas celulares, tras el residuo 383 de E1.

La caracterización espectroscópica de E2_{661p} mediante dicroísmo circular en el UV lejano indicó que, al igual que E2₆₆₁, la proteína presenta un alto

porcentaje de estructura β y aperiódica, siendo muy bajo su contenido en hélice α . Por tanto, no se han producido variaciones importantes en la estructura secundaria de E2₆₆₁ cuando se pliega en presencia de E1. Los espectros de emisión de fluorescencia indican que los Trp de E2₆₆₁p se encuentran en un entorno relativamente poco hidrofóbico, mostrando un máximo de emisión centrado en torno a 332 nm, por lo que tampoco se han producido variaciones importantes en cuanto al microentorno de los fluoróforos de la proteína, aunque el pequeño desplazamiento hacia el azul observado en el máximo de emisión, de 2 nm con respecto a E2₆₆₁, podría indicar que E2₆₆₁p presenta un plegamiento más compacto que E2₆₆₁.

El estado de oligomerización de E2₆₆₁p, analizado mediante PAGE-SDS en condiciones no reductoras, demostró que la proteína migraba en forma de cuatro bandas correspondientes a las formas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica, como ocurre con E2₆₆₁, aunque la proporción de la forma monomérica fue muy superior a la obtenida con la proteína plegada en ausencia de E1. Una explicación podría ser que, tal y como se ha propuesto, E1 actuaría como chaperona durante el plegamiento de E2, dificultando la formación de oligómeros. Otra posible explicación sería el hecho de que la proteína se encuentra mucho más diluida en el medio extracelular de las células de insecto, dada su baja secreción, y por tanto, las interacciones intermoleculares son menos frecuentes, lo que resulta en una disminución de la agregación.

La realización de un enzimoimmunoensayo empleando los sueros de pacientes infectados por el HCV permitió comprobar que E2₆₆₁p presenta el mismo patrón de reconocimiento que E2₆₆₁ por los anticuerpos presentes en los sueros, aunque se observó una disminución de la señal de un 30% con respecto a E2₆₆₁ con todos los sueros. Esto podría deberse al plegamiento ligeramente más compacto que presentaría la proteína, tal y como se observó en los espectros de fluorescencia, y por tanto daría lugar a que los epítomos reconocidos por los anticuerpos de los sueros estuvieran menos expuestos. La unión de E2₆₆₁p al anticuerpo H53 fue muy similar a la de E2₆₆₁, lo que demuestra que ambas presentan una conformación correcta, y que, al menos la región reconocida por este anticuerpo, no ha sufrido ningún cambio conformacional durante su plegamiento en presencia de E1.

Por lo tanto, los resultados obtenidos parecen indicar que la presencia de E1 durante el plegamiento de E2 no produce modificaciones importantes en la conformación de E2₆₆₁, aunque ciertas regiones de la proteína podrían presentar un plegamiento ligeramente más compacto.

Se realizaron ensayos de interacción lípido-proteína con el fin de comprobar si las pequeñas variaciones estructurales observadas en la proteína E2_{661p} están relacionadas con su capacidad para inducir agregación, mezcla de lípidos y liberación del contenido acuoso de vesículas de PG a pH 5.0. La baja concentración de proteína disponible sólo permitió realizar cinéticas a una única concentración de proteína.

La capacidad de inducir agregación de vesículas se vio reducida en un 60% a una concentración de proteína de 1 μ M en comparación con E2₆₆₁. Este efecto puede estar causado por la baja agregación que presenta la proteína E2_{661p}, al igual que se observó en el caso del mutante E2_{C652S}, confirmando la influencia de la presencia de oligómeros de E2 en la agregación de vesículas. Parece que a mayor cantidad de oligómeros de elevada masa molecular presentes en la muestra proteica, mayores son los agregados vesiculares obtenidos.

Los agregados inducidos por E2_{661p} acaban fusionando, al igual que con E2₆₆₁, a una concentración de proteína de 1 μ M, aunque la cinética del proceso es algo distinta con respecto a E2₆₆₁. En los primeros 200 segundos, la velocidad de dilución de sonda inducida por E2₆₆₁ es superior a la de E2_{661p}. En cambio, a partir de los 200 segundos la velocidad de dilución de sonda inducida por E2_{661p} es superior a la de E2₆₆₁, llegando ambas a un valor muy similar de dilución de sonda tras los 900 segundos en los que se realizó la medida.

Por otro lado, el efecto de E2_{661p} en la liberación de contenidos acuosos de las vesículas es idéntico al producido por E2₆₆₁, sin observarse diferencias en la cinética del proceso.

Por lo tanto, el plegamiento de E2 en presencia de E1 no parece alterar a la capacidad del ectodominio de E2 de inducir mezcla de lípidos ni liberación del

contenido acuoso de vesículas de PG a pH 5.0. Las pequeñas variaciones estructurales observadas en E2_{661p} afectarían a la cinética del proceso de fusión aunque sin modificar el resultado final. La obtención de esta proteína en mayor cantidad permitiría completar la caracterización tanto estructural como funcional de la misma con el fin de profundizar más en los efectos producidos por las pequeñas variaciones en la estructura terciaria de la proteína. En cualquier caso, los datos obtenidos en estos estudios ponen de manifiesto que la presencia de E1 durante el plegamiento de E2 no sería necesaria para su correcto plegamiento y su función, al menos en cuanto a su capacidad para interaccionar con lípidos. De esta manera, queda demostrado una vez más que el ectodominio de E2 se comporta como una unidad de plegamiento independiente.

6.4. IMPLICACIÓN DE E2 EN LA UNIÓN Y ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA

Como ya se ha mencionado anteriormente, las glicoproteínas de la envoltura del HCV median en la mayoría de los procesos de entrada del virión, incluyendo la unión a la célula, la endocitosis y la fusión en el entorno de bajo pH proporcionado por los endosomas tempranos (Blanchard *et al.*, 2006; Coller *et al.*, 2009; Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 2003; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; Op De Beeck *et al.*, 2004; Tscherne *et al.*, 2006). Las funciones individuales de estas glicoproteínas no han sido aún completamente establecidas. Aunque se ha demostrado que E2 se une a algunos de los factores celulares necesarios para la entrada del HCV, se conoce muy poco acerca del posible papel de E1, sobre todo debido a las dificultades para obtener una versión recombinante soluble de esta proteína.

En los apartados anteriores se ha estudiado el papel del ectodominio de la glicoproteína E2 en la fusión, quedando por caracterizar su papel en la unión y la entrada a la célula. Para ello, se han realizado ensayos de unión y colocalización con receptores celulares, inhibición de rutas de entrada así como ensayos de bloqueo de la infección de HCVpp en células de hepatoma humanas Huh7.

6.4.1. ESTUDIOS DE UNIÓN A LOS RECEPTORES CELULARES

La unión y entrada del HCV en los hepatocitos humanos requiere múltiples factores celulares. Entre ellos, se ha descrito que los receptores CD81 y SRBI interaccionan de manera directa con el ectodominio de E2 soluble (Pileri *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2002). En el caso de las proteínas de las uniones estrechas Claudina1 y Ocludina, no se ha conseguido demostrar una interacción directa de Claudina1 con las glicoproteínas del HCV, aunque en el caso de la Ocludina sí se ha descrito su coinmunoprecipitación y colocalización con E2 (Benedicto *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Ambas proteínas interaccionan con el HCV tras la unión del virus a CD81 y SRBI (Evans *et al.*, 2007).

La unión de E2 a CD81 se produce a través del LEL de CD81 (Petracca *et al.*, 2000). Se ha demostrado que una proteína E2 soluble es capaz de unirse a CD81 humano pero no a CD81 de ratón, rata o mono verde africano, sugiriendo que CD81 pueda ser un determinante para la restricción de especies observada en la infección por el HCV (Flint *et al.*, 1999; Higginbottom *et al.*, 2000). Sin embargo, CD81 no parece ser el único determinante celular, ya que ratones transgénicos que expresan CD81 humano no son permisivos frente a la infección por el HCV (Masciopinto *et al.*, 2002).

Con el fin de realizar ensayos de unión de la proteína recombinante E2₆₆₁ a CD81, se llevó a cabo la expresión y purificación del LEL de CD81 humano fusionado con GST en *E.coli*. De esta manera, se comprobó que E2₆₆₁ se une al LEL de CD81 de manera dependiente de la concentración, lo cual pone de manifiesto la adecuada conformación de la proteína E2₆₆₁ producida en baculovirus, que adoptaría una conformación similar a la que presentaría en la partícula viral.

Para determinar si el estado de oligomerización de la proteína E2 influye en la unión con LEL-CD81, se realizó el mismo ensayo de unión con la proteína E2_{C652S}, ya que presenta una proporción de monómero superior a E2₆₆₁. Los resultados obtenidos mostraron que la capacidad de unión de E2_{C652S} a LEL-CD81 es un 50% superior a la de E2₆₆₁, por lo que parece que la presencia de una mayor cantidad de monómero en el mutante permitiría que quedasen expuestos más sitios de unión al receptor que no serían accesibles en los

oligómeros presentes en E2₆₆₁. También se analizó la capacidad de unión de E2_{661p} a LEL-CD81, comprobándose que dicha proteína presenta una capacidad de unión muy similar a E2₆₆₁. Esto indicaría nuevamente que las pequeñas variaciones observadas en la conformación de esta proteína con respecto a E2₆₆₁ no afectan a su capacidad de interaccionar con el receptor celular CD81, y refuerza nuevamente la hipótesis de que E2 constituye una unidad de plegamiento independiente.

Por otro lado, Bankwitz, y col. (2010) observaron que el LEL de CD81 humano neutralizaba y precipitaba HCVpp con la región HVR1 de E2 delecionada mucho más fácilmente que las HCVpp salvajes, demostrando que la región HVR1 de E2 enmascara el sitio de unión a CD81. Esta hipótesis se comprobó gracias a que se disponía de un mutante que carece de la región HVR1 de E2, E2₄₃₀ (aminoácidos 430 a 661), descrito en una tesis anterior del grupo (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007). Además, con el fin de comprobar la especificidad de la unión E2-CD81, se diseñó un mutante careciendo de los residuos 522 a 535 de la proteína E2, E2_{Δ522}, ya que muchos estudios apuntan a que algunos de los residuos comprendidos en esta región son necesarios para la interacción con CD81 (Drummer *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2006; Roccasecca *et al.*, 2003; Rothwangl *et al.*, 2008; Rychlowska *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos mostraron que E2₄₃₀ presenta una capacidad para interaccionar con CD81 un 30% superior a E2₆₆₁, lo que confirma la hipótesis del bloqueo del sitio de unión a CD81 por la región HVR1, mientras que E2_{Δ522} conserva sólo el 40% de la capacidad de E2₆₆₁ para interaccionar con CD81, corroborando la especificidad de la interacción E2-CD81. Posiblemente, el sitio de unión de E2 a CD81 en las HCVpp se encuentra escondido hasta que se produce la interacción con un factor celular que provoca un cambio conformacional dando lugar a la exposición del sitio de unión a CD81 y preparando al virus para el contacto con el mismo. Esta estrategia también se ha observado en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) que interacciona con CD4, produciéndose un cambio conformacional que facilita el contacto con los receptores de quimioquinas tipo CXCR4 o CCR5 (Wyatt y Sodroski, 1998). Este mecanismo podría facilitar la evasión de las respuestas inmunes neutralizantes a través de la

protección de epítomos virales conservados necesarios para las interacciones con receptores esenciales.

Una vez demostrado que E2₆₆₁ es capaz de interaccionar con el LEL de CD81 humano de manera específica, se procedió a comprobar si la proteína es capaz de unirse a este receptor en un contexto celular. Para ello se transfectaron células CHO con CD81 humano completo y se midió la unión de E2₆₆₁ y E2_{C652S} al receptor. Ambas proteínas fueron capaces de unirse de manera inespecífica a las células CHO sin transfectar, pero también se observó una unión específica con CD81, ya que hay una mayor interacción cuando las células están transfectadas con este receptor. Para corroborar si la mayor unión observada en las células transfectadas era debida a la unión de las proteínas al receptor CD81 de manera específica, se procedió a preincubar las células con un anticuerpo bloqueante del sitio de unión a E2 en CD81, observándose una disminución en la unión a las células transfectadas hasta alcanzar un valor similar al obtenido con las células no transfectadas. Este resultado demuestra la especificidad de la unión de E2₆₆₁ y E2_{C652S} al receptor CD81 humano completo, observándose nuevamente una mayor capacidad de unión de E2_{C652S} al receptor. Es más, si nos fijamos en la forma del histograma obtenido en la Figura 69 del apartado 5.4 de Resultados, se observan dos poblaciones diferenciadas de células transfectadas que se unen a E2_{C652S}, una con baja intensidad de fluorescencia y la otra con una mayor intensidad de fluorescencia, que presentan un número de eventos similar. En cambio, en el caso de E2₆₆₁ se observa una única población de células con una intensidad de fluorescencia intermedia entre las dos poblaciones de células observadas con E2_{C652S}. Este resultado podría indicar que la población con mayor intensidad de fluorescencia observada con E2_{C652S} correspondería a la unión de la forma monomérica de la proteína con CD81, presentando una mayor unión al receptor, mientras que en E2₆₆₁ la menor proporción de monómero no permite observar las dos poblaciones.

En cualquier caso, se ha conseguido demostrar que la unión de E2₆₆₁ y E2_{C652S} al receptor CD81 es específica, y que ambas proteínas presentan una conformación similar a la que presentarían en la partícula viral. Además, la presencia de agregados en E2₆₆₁ podría enmascarar algunos de los sitios de unión al receptor.

Por último, se llevaron a cabo ensayos de colocalización con algunos de los receptores descritos para el HCV en células Huh7 mediante inmunofluorescencia. En las imágenes obtenidas por microscopía confocal se observó que E2₆₆₁ colocalizaba con los receptores CD81 y SRBI, tanto en la membrana como en el interior celular, siendo mayor la colocalización observada con SRBI. Parece, por tanto, que ambos receptores podrían estar implicados no sólo en la unión a E2, sino también en su internación. En cambio con Claudina1 no se observó colocalización. Estos resultados indican la existencia de una interacción directa de E2 con CD81 y SRBI, mientras que la interacción con Claudina1 no sería directa con E2₆₆₁, de acuerdo con observaciones previas, que sugieren que Claudina1 no interacciona ni con E1 ni con E2 (Cuckierman *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2007).

6.4.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LAS RUTAS DE ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA

Los virus pueden utilizar diferentes rutas endocíticas para entrar en las células huésped, incluyendo: a) macropinocitosis, proceso donde las sustancias presentes en el fluido extracelular son internadas de manera inespecífica; b) endocitosis mediada por receptor, incluyendo las vías dependientes de clatrina y caveolina; c) mecanismos endocíticos basados en balsas lipídicas que son independientes de clatrina y caveolina. Las vías de tráfico de receptores definen a menudo las rutas de internación de las partículas de manera que los virus suelen entrar en la célula por un único mecanismo de entrada, aunque se han descrito ejemplos donde los virus utilizan múltiples mecanismos en diversos tipos celulares (Damm *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2009). La inhibición de ciertas rutas puede inducir estrategias compensatorias que activen mecanismos endocíticos alternativos para la entrada del virus. En general, los estudios realizados con los virus de la familia *Flaviviridae* indican que la entrada tiene lugar a través de vesículas recubiertas de clatrina (Chu y Ng, 2004; Lecot *et al.*, 2005).

En el caso del HCV, el uso de drogas como la bafilomicina A y la concanamicina A (que inhiben la ATPasa vacuolar, disipando los gradientes de

protonación de la membrana) demostraron la dependencia de la entrada del virus con el pH, implicando la participación de la endocitosis mediada por receptor y la fusión en un compartimento endosomal ácido (Blanchard *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Tscherne *et al.*, 2006). Un estudio reciente con ARN de interferencia confirmó la participación de varios genes implicados en la endocitosis mediada por clatrina y la polimerización de actina en el proceso de entrada viral (Coller *et al.*, 2009). También, se ha demostrado la implicación de microtúbulos en la entrada del virus, que probablemente sean requeridos para la migración de las vesículas revestidas de clatrina hacia los sitios intracelulares adecuados (Roohvand *et al.*, 2009).

Con el fin de estudiar la ruta de entrada seguida por la proteína E2₆₆₁ en las células Huh7 se realizaron estudios de inhibición de diferentes vías endocíticas empleando drogas específicas. El efecto de las distintas drogas se observó mediante microscopía confocal de fluorescencia. En la Tabla 16 se muestra un resumen de las drogas empleadas y su efecto.

DROGA	EFEECTO
Clorpromacina	Inhibe la endocitosis dependiente de clatrina
Óxido de fenilarsina (PAO)	Inhibe la endocitosis mediada por receptor
Citocalasina D (Cyt D)	Interrumpe la polimerización de actina
β -metil ciclodextrina (β mCD)	Elimina el colesterol de las membranas
Cloruro amónico (NH ₄ Cl)	Inhibe la acidificación endosomal

Tabla 16. Efecto de las distintas drogas empleadas para la inhibición de diferentes rutas endocíticas en las células Huh7.

El tratamiento con clorpromacina inhibe la entrada de E2₆₆₁ en las células, quedándose la proteína localizada en la membrana junto con la transferrina, proteína usada como control positivo, que se interna mediante endocitosis mediada por clatrina. El mismo efecto se observó al tratar las células con PAO: la mayor parte de la proteína se queda en la membrana, si bien una parte es

endocitada, probablemente a través de otro mecanismo de entrada, como puede ser la macropinocitosis. Por ello se trataron las células con CytD, que impide la polimerización de filamentos actina. El efecto de esta droga no impide la internación de E2₆₆₁, aunque parte de la proteína queda retenida en la membrana. Esto indica que la vía preferida para el entrada del HCV es la endocitosis mediada por receptor vía clatrina, aunque la inhibición de esta ruta podría activar vías de entradas alternativas como la macropinocitosis. También se estudió el efecto de la eliminación del colesterol de las membranas mediante el tratamiento con β -mCD con el fin de eliminar los TEMs (dominios ricos en tetraspaninas, como CD81), ya que son regiones de la membrana ricas en colesterol y glicoesfingolípidos. El control positivo usado en este caso fue la subunidad B de la toxina del cólera, ya que se une a gangliósidos GM1 (monosialotetrahexosilgangliósido) (Van Heyningen *et al.*, 1976) localizados en balsas lipídicas o *rafts*, también ricas en colesterol. Se observó que tras el tratamiento con β -mCD la subunidad B de la toxina del cólera no se unía a las células, desapareciendo su marcaje, mientras que E2₆₆₁ presentaba un marcaje más localizado en la membrana, lo que indica que la localización de CD81 en los dominios TEMs es importante para su interacción con el receptor y su internación. Aún así, se observó que parte de la proteína es endocitada, lo que indicaría nuevamente que la endocitosis de E2 se produciría por una vía alternativa cuando se inhibe la vía de entrada principal, y/o que puede haber otros receptores de E2, como SRBI, que no se localiza en regiones TEM, que también podría estar implicado en la endocitosis de E2.

Por último, se estudió el efecto de la inhibición de la acidificación de los endosomas, donde tiene lugar la fusión. Previamente se demostró que E2₆₆₁ se acumulaba en parte en los endosomas tempranos (Rodríguez M., Tesis Doctoral, 2007). El tratamiento de las células con NH₄Cl tiene como efecto una menor colocalización con los endosomas marcados con EEA1. Parece ser que las vesículas revestidas de clatrina, antes de fusionarse con los endosomas tempranos, pasan por compartimentos pre-endosomales donde pueden quedar retenidas (Lakadamyali *et al.*, 2006). Esto explicaría el efecto observado con esta droga, quedándose la proteína E2₆₆₁ retenida en vesículas que no llegan a fusionar con los endosomas tempranos. Por tanto, al igual que sucede con el

virus completo, la entrada y el transporte de E2₆₆₁ a los compartimentos intracelulares donde tiene lugar la fusión es dependiente del bajo pH que presentan estos compartimentos.

Por tanto, el estudio de las rutas de entrada de la proteína E2₆₆₁ en las células de hepatoma humanas Huh7 ha demostrado que la proteína es internada principalmente a través de endocitosis mediada por receptor, probablemente con la participación de CD81 localizado en TEMs, y se produce a través de vesículas revestidas de clatrina, siendo transportada a los endosomas tempranos gracias al pH ácido de este compartimento intracelular. Estas observaciones están de acuerdo con los estudios previos realizados por diversos grupos con los sistemas de HCVpp y HCVcc, lo que sugiere que E2 participa activamente en la entrada del virus en la célula.

Con los datos que se han obtenido en los experimentos de unión y entrada realizados con la proteína recombinante E2₆₆₁, y gracias a los datos de que se dispone en la bibliografía acerca del mecanismo de entrada del HCV en la actualidad, se ha propuesto el siguiente modelo para explicar el mecanismo seguido por la proteína E2₆₆₁ en la unión y entrada en la célula (Figura 87). La unión de E2 a la célula está mediada por múltiples factores celulares. Entre ellos, se ha descrito que los GAGs presentes en la superficie celular, y en concreto los proteoglicanos tipo heparan sulfato, interaccionan con E2 soluble (Barth *et al.*, 2003), pudiendo constituir una unión de baja afinidad que permitiría la interacción de la proteína con otros receptores de mayor especificidad. A continuación tendría lugar la interacción de E2 con SRBI y CD81. En el caso del virus completo se ha descrito que la secuencia de eventos sería, en primer lugar una interacción con SRBI, tras lo cual se produciría la interacción con el receptor CD81 (Evans *et al.*, 2007), aunque en este modelo propuesto con E2₆₆₁, y dado que la proteína es capaz de interaccionar con CD81 directamente, la interacción con ambos receptores se produciría simultáneamente. La unión con SRBI sería a través de la región HVR1 de E2 (Bartosch *et al.*, 2003a; Scarselli *et al.*, 2002). La interacción con CD81 se produce a través de LEL de CD81, aunque el sitio de unión en E2 no ha sido caracterizado completamente. CD81 se encuentra

localizado en regiones TEM, cuya composición podría ser regulada por SRBI. El hallazgo de complejos CD81-Claudina1 en estas regiones de la membrana de las células de hepatoma (Harris *et al.*, 2010), así como el hecho de que la perturbación de estos complejos dé lugar a la inhibición de la entrada del HCV (Farquhar *et al.*, 2008), sugiere que tras su interacción con E2, CD81 interaccionaría con Claudina1 en las regiones TEM a través del primer lazo extracelular de Claudina1 (Harris *et al.*, 2010). El complejo E2/CD81/Claudina 1 sería transportado a las uniones estrechas a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, donde se produciría la interacción con Ocludina. Parece que existe una interacción directa de E2 con Ocludina (Benedicto *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009), y que las interacciones con este receptor desencadenarían la endocitosis mediada por clatrina. Las vesículas revestidas de clatrina transportarían a la proteína E2 a los endosomas tempranos gracias al pH ácido de este compartimento. Sin embargo, todavía no se han conseguido determinar todos los factores celulares y virales que determinan la endocitosis del virus en la célula.

6.4.3. BLOQUEO DE LA INFECCIÓN DE HCVpp EN CÉLULAS Huh7

Con el fin de comprobar la capacidad de la glicoproteína E2₆₆₁ para competir con pseudopartículas infectivas del HCV (HCVpp) por la unión a los receptores celulares, se realizaron ensayos de bloqueo de la infección mediada por dichas partículas en células Huh7. Como control positivo del bloqueo de la infección se empleó un anticuerpo anti-CD81 que fue capaz de inhibir completamente la infección por HCVpp a una concentración de 50 µg/ml. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína E2₆₆₁ no era capaz de bloquear la infección por HCVpp correspondientes al genotipo 1a línea H77, ya que no se obtuvo inhibición con concentraciones de proteína de hasta 100 µg/ml. Este resultado indica que la afinidad de E2₆₆₁ por la unión a sus receptores es muy inferior a la que presenta la glicoproteína E2 en las HCVpps. Además, tampoco se obtuvo un bloqueo de la infección por HCVpp con las proteínas E2_{C652S} y E2_{661p}, indicando que este resultado no era debido a la presencia de agregados

ni a las posibles variaciones en la conformación de la proteína en ausencia de E1 durante su plegamiento.

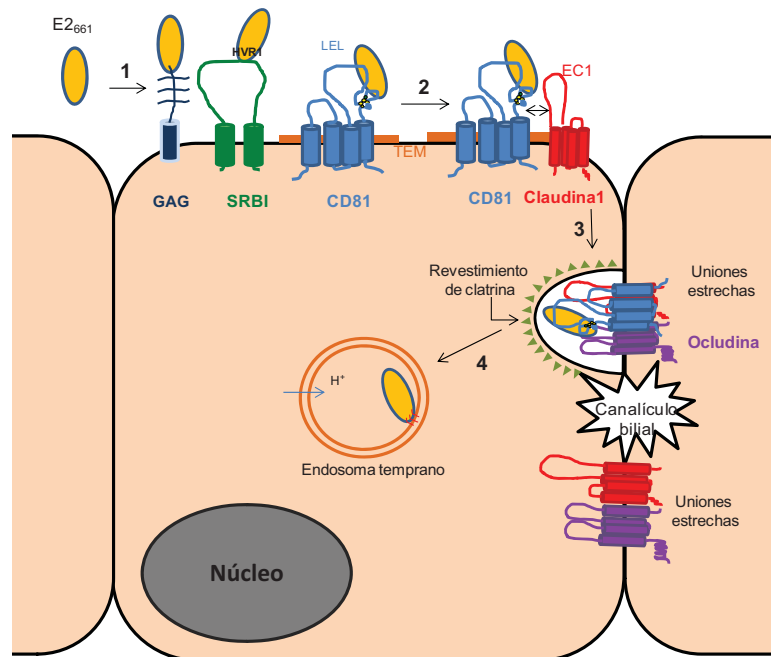


Figura 87. Modelo propuesto para el mecanismo de unión y entrada de la proteína E2₆₆₁ en la célula. Paso 1) La proteína E2₆₆₁ interactúa con receptores presentes en la superficie de la célula, como GAGs, SRBI y CD81. Paso 2) CD81 se encuentra en dominios ricos en tetraspaninas (TEMs) donde interacciona con uno de los componentes de las uniones estrechas, Claudina1. Paso 3) El complejo formado por E2₆₆₁/CD81/Claudina1 es transportado a las uniones estrechas mediante reorganizaciones del citoesqueleto de actina, donde la interacción con otro de los componentes de las uniones estrechas, Ocludina, permite la endocitosis mediada por clatrina. Paso 4) E2₆₆₁ es transportada a los endosomas tempranos de manera dependiente del pH ácido de este compartimento. Una vez en los endosomas, el pH ácido facilita la interacción electrostática de E2₆₆₁ con los fosfolípidos ácidos de su membrana, y la inserción de los péptidos fusogénicos de la proteína.

Una posible explicación de estos resultados es que la secuencia de la proteína E2₆₆₁ empleada en estos estudios corresponde al genotipo 1a, línea PT, mientras que la secuencia de las glicoproteínas de la superficie de las HCVpp comúnmente empleadas corresponde al genotipo 1a, línea H77. Con el fin de determinar si las diferencias en las secuencias de aminoácidos correspondientes

H77 384 ETHVTGGNAGRRTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSHINSTALNCNESLNTGWLAGLFY 443
PT 384 ETHVTGGTAAQTAGLVSLSPGAKQDIQLINTNGSHINSTALNCNDSLYTGWLAGLFY 443
 *****:*****
H77 444 QHKFNSSGCPERLTSRRLTDFAGQGWGPISYANGSGLDE RPYCWHYPPRPGCIVPAKSVC 503
PT 444 HHKFNSSGCPERFASCRPLTDFAGQGWGPISHANGSGPDORPYCWHYPPKPGCIVPAKSVC 503
 :*****:*****
H77 504 GPVYCFTPSPVVVGTTRDSGAPTYSWGA DTFVFLVNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGTFTKV 563
PT 504 GPVYCFTPSPVVVGTTRDSGAPTYSWGA DTFVFLVNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGTFTKV 563
 *****:*****
H77 564 CGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPTRLWHYPTCTIN 623
PT 564 CGAPPCVIGGVGNNTLHCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCLVNPTRLWHYPTCTIN 623
 *****:*****
H77 624 YTIFKVRMYVGVEHRLEAACNWRTRGERCDLEDNRDRELSPLLLSTTQWQVLPCSFTTPL 683
PT 624 YTIFKVRMYVGVEHRLEAACNWRTRGERCNLEDNRDRELSPLLLSTTQWQVLPCSFTTPL 683
 *****:*****
H77 743 ALSTGLIHLHQNIVDVQYLYGVGSSIASWAIKF EYVVLLFLLADARVCSCILWMLLLISQ 743
PT 743 ALSTGLIHLHQNIVDVQYLYGVGSSIASWAIKF EYVVLLFLLADARVCSCILWMLLLISQ 743

H77 744 AEA 746
PT 744 AEA 746

Figura 88. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de E2 líneas H77 y PT. La región transmembrana de E2 aparece dentro de un recuadro rojo, y las regiones hipervariables en recuadros azules. Los sitios de N-glicosilación aparecen en naranja y los posibles sitios de unión a CD81 sombreados en verde. (*) Residuos completamente conservados; (:) residuos con propiedades muy similares; (.) residuos con algunas propiedades similares. Los espacios indican que los residuos no tienen ninguna propiedad en común.

En la actualidad se está procediendo a la producción de la proteína E2₆₆₁ con la secuencia H77 utilizando el sistema de expresión de baculovirus. Una vez aislada, se comparará con la proteína E2₆₆₁ secuencia PT en cuanto a sus propiedades estructurales y funcionales, además de comprobar su capacidad para el bloqueo de la infectividad de las HCVpp H77.

Con el objetivo de comprobar si la secuencia de E2 línea PT es infectiva, se llevó a cabo la construcción de HCVpp con la secuencia de E2 PT en lugar de E2 H77. La infección de células Huh7 con dichas partículas permitió observar que la secuencia de E2 PT sí es infectiva, aunque se obtuvieron unos niveles de infección inferiores a los obtenidos con E2 H77, confirmándose la hipótesis de que la afinidad de E2 H77 por los receptores celulares sería mayor que la de E2 PT. La inmunodetección de las glicoproteínas E1 y E2 expresadas tanto en el lisado de las células HEK 293T usadas para la transfección, como en las partículas, permitió comprobar que ambas glicoproteínas se incorporan adecuadamente a las partículas, aunque la cantidad de E1 incorporada en las partículas con E2 PT es inferior a la cantidad de E1 observada en las HCVpp con E2 H77. Este hecho podría explicar la menor infectividad observada con las partículas con E2 PT, pudiendo encontrarse mutado algún residuo participante en la interacción con E1.

En definitiva, estas observaciones explicarían la incapacidad de E2₆₆₁ para bloquear la infección por las HCVpps H77, y demuestran que la secuencia de E2 PT es infectiva y por tanto válida para los ensayos celulares que se han realizado en la presente tesis.

Por otro lado, muchos autores han utilizado tanto péptidos derivados de E2 (Puig *et al.*, 2004; Torresi *et al.*, 2007), como las proteínas solubles E2 y E1E2 (Esumi *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2008; Stamataki *et al.*, 2007) y también HCV-LP (Qiao *et al.*, 2003), para inmunizar animales con el objetivo de conseguir anticuerpos anti-HCV capaces de neutralizar la infección por el virus. Dado que en nuestro grupo disponíamos de un anticuerpo anti-E2₆₆₁-PT purificado a partir del suero de un conejo inmunizado frente a E2₆₆₁ secuencia PT, se procedió a comprobar la capacidad neutralizante de dicho anticuerpo frente a las infección

por HCVpp genotipo H77 que, como ya se ha comentado anteriormente, son altamente infectivas. De esta manera, se pudo comprobar que el anti-E2-PT era capaz de bloquear totalmente la infección de dichas partículas a una dilución de 1/128, mientras que el anticuerpo H48 usado como control positivo sólo fue capaz de inhibir la infección un 35% a la misma dilución.

Este resultado indica que, pese a no ser capaz de bloquear por sí misma la infección de las HCVpp H77, la proteína E2₆₆₁ PT sí es capaz de inducir la generación de anticuerpos capaces de neutralizar la infección de dichas partículas, pudiendo constituir una herramienta muy útil para el diseño de vacunas frente al virus, dada su pureza y alto rendimiento de purificación.

CONCLUSIONES

- 1) Se han obtenido mutantes de delección de posibles regiones fusogénicas del ectodominio de la glicoproteína E2 del HCV empleando el sistema de expresión de baculovirus con un elevado rendimiento. La delección de las regiones 430-449, 543-560 y 603-624 de manera conjunta impide una fusión total de vesículas de fosfolípidos ácidos a pH 5.0. Sin embargo, serían necesarias otras regiones de la proteína E2 para inhibir completamente la fusión, puesto que E2_{TM} sigue manteniendo cierta capacidad fusogénica.

Además, la región 603-624 podría adoptar una estructura helicoidal en presencia de vesículas de PG en una manera dependiente de pH ácido, lo que sugiere que podría insertarse en la membrana, mientras que las regiones 430-449 y 543-560 de la proteína podrían ser necesarias para la inserción de esta región en la membrana.

La delección de la región 502-520 afecta drásticamente al estado de oligomerización y a la estructura tridimensional de la proteína, imposibilitando el estudio de sus propiedades fusogénicas.

- 2) El empleo del mutante E2_{TM}E1 ha permitido observar el efecto de E1 en las propiedades fusogénicas de E2, comprobándose que E1 actuaría como proteína acompañante previniendo la exposición de las regiones fusogénicas de E2 a pH neutro. En cambio, parece que E1 participa activamente en la liberación de contenidos acuosos, proceso que tendría lugar antes de la fusión.
- 3) La sustitución de la Cys 652 de E2₆₆₁ por una Ser ha permitido obtener una proteína con un rendimiento y una proporción monomérica superiores a E2₆₆₁, lo cual demuestra que dicha Cys está implicada en la formación de un puente disulfuro intermolecular que interviene en la formación de oligómeros. Además, se ha demostrado que la presencia de agregados en E2₆₆₁ no afecta a la funcionalidad de la proteína en cuanto a los ensayos de interacción con lípidos, aunque sí disminuye la accesibilidad a los sitios de unión con el receptor celular CD81.

- 4) El plegamiento del ectodominio de E2 en presencia de E1 indica que E2 constituye una unidad de plegamiento independiente, ya que no se han observado variaciones estructurales ni funcionales importantes con respecto a la proteína E2 plegada en ausencia de E1.
- 5) Los estudios de unión a los receptores celulares han demostrado que la proteína E2₆₆₁ producida en baculovirus presenta una conformación muy similar a la que debe presentar en la partícula viral. Así, E2₆₆₁ interacciona de manera específica con CD81 a través del lazo extracelular grande del receptor. Además, la región HVR1 de E2 bloquearía parcialmente el sitio de unión con el receptor, protegiéndolo de la unión de anticuerpos neutralizantes. E2₆₆₁ también interacciona de manera directa con SRBI, mientras que no se observa una interacción directa con Claudina1.
- 6) Al igual que se ha observado para las partículas virales, la endocitosis de E2₆₆₁ tiene lugar tras la unión a sus receptores en vesículas revestidas de clatrina y es transportada a los endosomas tempranos, de manera dependiente del pH ácido de este compartimento.
- 7) La inmunización de conejos con la proteína recombinante E2₆₆₁ producida en baculovirus, permite obtener anticuerpos capaces de neutralizar la infección por el sistema de HCVpp en células Huh7. Este resultado junto con el alto rendimiento de purificación y pureza de esta proteína señalan el potencial de la misma como herramienta para el diseño de vacunas frente a la infección por el HCV.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acton, S. L., Scherer, P. E., et al. (1994). "Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor." *J. Biol. Chem.* 269(33): 21003-9.
- Afdhal, N. H. (2004). "The natural history of hepatitis C." *Semin. Liver Dis.* 24 Suppl 2: 3-8.
- Agnello, V., Ábel, G., et al. (1999). "Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(22): 12766-12771.
- Aizaki, H., Morikawa, K., et al. (2008). "Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection." *J. Virol.* 82(12): 5715-24.
- Akazawa, D., Date, T., et al. (2007). "CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection." *J. Virol.* 81(10): 5036-45.
- Albecka, A., Montserret, R., et al. (2011). "Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2." *J. Virol.* 85(4): 1777-92.
- Alegre-Cebollada, J., Cunietti, M., et al. (2008). "Calorimetric scrutiny of lipid binding by sticholysin II toxin mutants." *J. Mol. Biol.* 382(4): 920-30.
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., et al. (2004). "Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption." *Science* 303(5661): 1201-4.
- Alvisi, G., Madan, V., et al. (2011). "Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection." *RNA Biol.* 8(2): 258-69.
- Andersson, H., Barth, B. U., et al. (1997). "Oligomerization-dependent folding of the membrane fusion protein of Semliki Forest virus." *J. Virol.* 71(12): 9654-63.
- André, P., Komurian-Pradel, F., et al. (2002). "Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles." *J. Virol.* 76(14): 6919-28.
- André, P., Perlemuter, G., et al. (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." *Semin. Liver Dis.* 25(1): 93-104.
- Appel, N., Schaller, T., et al. (2006). "From structure to function: New insights into hepatitis C virus RNA replication." *J. Biol. Chem.* 281(15): 9833-9836.
- Appel, N., Zayas, M., et al. (2008). "Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly." *PLoS Pathog.* 4(3): e1000035.
- Bain, C., Parroche, P., et al. (2004). "Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection." *J. Virol.* 78(19): 10460-9.
- Bankwitz, D., Steinmann, E., et al. (2010). "Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes." *J. Virol.* 84(11): 5751-63.
- Barba, G., Harper, F., et al. (1997). "Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94(4): 1200-5.
- Bartenschlager, R., Frese, M., et al. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." *Adv. Virus Res.* 63: 71-180.
- Bartenschlager, R., Penin, F., et al. (2011). "Assembly of infectious hepatitis C virus particles." *Trends Microbiol.* 19(2): 95-103.
- Barth, H., Schafer, C., et al. (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." *J. Biol. Chem.* 278(42): 41003-41012.
- Barth, H. (2010). "Insights into the role of interferon lambda in hepatitis C virus infection." *J. Hepatol.* 54(5): 844-7.
- Bartlett, G. R. (1959). "Phosphorus assay in column chromatography." *J Biol Chem* 234(3): 466-8.
- Bartosch, B., Bukh, J., et al. (2003c). "In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(24): 14199-204.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., et al. (2003a). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." *J. Exper. Med.* 197(5): 633-642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., et al. (2003b). "Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor." *J. Biol. Chem.* 278(43): 41624-41630.

- Bartosch, B., Verney, G., et al. (2005). "An interplay between hypervariable region 1 of the Hepatitis C Virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies." *J. Virol.* 79(13): 8217-8229.
- Bartosch, B. y Cosset, F. L. (2006). "Cell entry of hepatitis C virus." *Virology* 348(1): 1-12.
- Bartosch, B. y Dubuisson, J. (2010). "Recent advances in hepatitis C virus cell entry." *Viruses* 2(3): 692-709.
- Baumert, T. F., Ito, S., et al. (1998). "Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus like particles in insect cells." *J. Virol.* 72: 3827-3836.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., et al. (2008). "Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum." *Hepatology* 48(4): 1044-53.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., et al. (2009). "The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection." *J. Virol.* 83(16): 8012-20.
- Berger, K. L., Cooper, J. D., et al. (2009). "Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106(18): 7577-82.
- Blanchard, E., Belouzard, S., et al. (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." *J. Virol.* 80(14): 6964-6972.
- Blight, K. J. y Rice, C. M. (1997). "Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." *J. Virol.* 71(10): 7345-52.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A., et al. (2000). "Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture." *Science* 290: 1972-1974.
- Blumenthal, R., Henkart, M., et al. (1983). "Clathrin-induced pH-dependent fusion of phosphatidylcholine vesicles." *J. Biol. Chem.* 258(5): 3409-15.
- Boulant, S., Vanbelle, C., et al. (2005). "Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features." *J. Virol.* 79(17): 11353-65.
- Boulant, S., Montserret, R., et al. (2006). "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *J. Biol. Chem.* 281(31): 22236-47.
- Boulant, S., Douglas, M. W., et al. (2008). "Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner." *Traffic* 9(8): 1268-82.
- Bowen, D. G. y Walker, C. M. (2005). "Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection." *Nature* 436(7053): 946-952.
- Bradley, D., McCaustland, K., et al. (1991). "Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose." *J. Med. Virol.* 34(3): 206-8.
- Branch, A. D., Stump, D. D., et al. (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." *Semin. Liver. Dis.* 25(1): 105-17.
- Brass, V., Bieck, E., et al. (2002). "An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *J. Biol. Chem.* 277(10): 8130-9.
- Brauner, J. W., Flach, C. R., et al. (2005). "A quantitative reconstruction of the amide I contour in the IR spectra of globular proteins: from structure to spectrum." *J. Am. Chem. Soc.* 127(1): 100-9.
- Brazzoli, M., Helenius, A., et al. (2005). "Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells." *Virology* 332(1): 438-453.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., et al. (2008). "CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes." *J. Virol.* 82(17): 8316-29.
- Bressanelli, S., Tomei, L., et al. (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96(23): 13034-9.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., et al. (2004). "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation." *Embo J* 23(4): 728-38.
- Calvo, D. y Vega, M. A. (1993). "Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family." *J. Biol. Chem.* 268(25): 18929-35.
- Callens, N., Ciczora, Y., et al. (2005). "Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 contribute to virus entry." *J. Virol.* 79(24): 15331-15341.

- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., et al. (2002). "Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus." *J. Virol.* 76(8): 3720-3730.
- Ciczora, Y., Callens, N., et al. (2007). "Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: Residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry." *J. Virol.* 81(5): 2372-2381.
- Cocquerel, L., Meunier, J. C., et al. (1998). "A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2." *J. Virol.* 72: 2183-2191.
- Cocquerel, L., Duvet, S., et al. (1999). "The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum." *J. Virol.* 73(4): 2641-2649.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., et al. (2000). "Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a mayor role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins." *J. Virol.* 74(8): 3623-3633.
- Cocquerel, L., de Beeck, A. O., et al. (2002). "Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *Embo Journal* 21(12): 2893-2902.
- Cocquerel, L., Quinn, E. R., et al. (2003). "Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody." *J. Virol.* 77(2): 1604-1609.
- Cocquerel, L., Voisset, C., et al. (2006). "Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions." *J. Gen. Virol.* 87: 1075-1084.
- Codran, A., Royer, C., et al. (2006). "Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis." *J. Gen. Virol.* 87: 2583-2593.
- Cohen, J. (1999). "The Scientific Challenge of Hepatitis C." *Science* 285: 26-30.
- Cole, J. L. y Hansen, J. C. (1999). "Analytical ultracentrifugation as a contemporary biomolecular research tool." *J. Biomol. Tech.* 10(4): 163-76.
- Coller, K. E., Berger, K. L., et al. (2009). "RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis." *PLoS Pathog.* 5(12): e1000702.
- Cormier, E. G., Durso, R. J., et al. (2004a). "L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (0209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus." *PNAS USA* 101(39): 14067-14072.
- Cormier, E. G., Tsamis, F., et al. (2004b). "CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus." *PNAS USA* 101(19): 7270-7274.
- Coyne, C. B. y Bergelson, J. M. (2006). "Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions." *Cell* 124(1): 119-31.
- Cukierman, L., Meertens, L., et al. (2009). "Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts." *J. Virol.* 83(11): 5477-84.
- Chang, K. S., Jiang, J., et al. (2007). "Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture." *J. Virol.* 81(24): 13783-93.
- Chen, Y., Maguire, T., et al. (1997). "Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate." *Nat. Med.* 3(8): 866-71.
- Choo, Q. L., Richman K.H., et al. (1991). "Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2451-2455.
- Choo, Q. L., Kuo, G., et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* 244(4902): 359-62.
- Choukhi, A., Ung, S., et al. (1998). "Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins." *J. Virol.* 72(5): 3851-8.
- Chu, J. J. y Ng, M. L. (2004). "Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells." *J. Biol. Chem.* 279(52): 54533-41.
- Damm, E. M., Pelkmans, L., et al. (2005). "Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae." *J. Cell Biol.* 168(3): 477-88.
- Daneker, G. W., Lund, S. A., et al. (1998). "Culture and characterization of sinusoidal endothelial cells isolated from human liver." *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 34(5): 370-7.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., et al. (1983). "pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(8): 2258-62.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., et al. (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." *J. Virol.* 71(1): 697-704.

- Diepolder, H. M., Zachoval, R., et al. (1995). "Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection." *Lancet* 346(8981): 1006-7.
- Dreux, M., Pietschmann, T., et al. (2006). "High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI." *J. Biol.Chem.* 281(27): 18285-18295.
- Dreux, M., Dao Thi, V. L., et al. (2009). "Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains." *PLoS Pathog.* 5(2): e1000310.
- Drummer, H. E. y Pombourios, P. (2004). "Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry." *J. Biol. Chem.* 279(29): 30066-30072.
- Drummer, H. E., Boo, I., et al. (2006). "A conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry." *J. Virol.* 80(16): 7844-53.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., et al. (1994). "Formation and intracellular localization of hepatitis C virus enveloped glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and sindbis viruses." *J. Virol.* 68(10): 6148-6160.
- Dubuisson, J. y Rice, C. M. (1996). "Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin." *J. Virol.* 70(2): 778-86.
- Dubuisson, J., Duvet, S., et al. (2000). "Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein." *J. Biol. Chem.* 275(39): 30605-30609.
- Dubuisson, J., Penin, F., et al. (2002). "Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids." *Trends in Cell Biol.* 12(11): 517-523.
- Duvet, S., Op De Beeck, A., et al. (2002). "Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 occurs posttranslationally in a mannosylphosphoryldolichol-deficient CHO mutant cell line." *Glycobiology* 12(2): 95-101.
- Egger, D., Wolk, B., et al. (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *J. Virol.* 76(12): 5974-5984.
- Einav, S., Elazar, M., et al. (2004). "A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication." *J. Virol.* 78(20): 11288-95.
- Einav, S., Sklan, E. H., et al. (2008). "The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection." *Hepatology* 47(3): 827-35.
- Ellens, H., Bentz, J., et al. (1985). "H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes." *Biochemistry* 24(13): 3099-106.
- Esumi, M., Rikihisa, T., et al. (1999). "Experimental vaccine activities of recombinant E1 and E2 glycoproteins and hypervariable region 1 peptides of hepatitis C virus in chimpanzees." *Arch. Virol.* 144: 973-980.
- Evans, M. J., Rice, C. M., et al. (2004). "Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101(35): 13038-43.
- Evans, M. J., von Hahn, T., et al. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." *Nature* 446: 801-805.
- Falkowska, E., Durso, R. J., et al. (2006). "L-SIGN (CD209L) isoforms differently mediate trans-infection of hepatoma cells by hepatitis C virus pseudoparticles." *J. Gen. Virol.* 87(Pt 9): 2571-6.
- Farquhar, M. J., Harris, H. J., et al. (2008). "Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity." *J. Virol.* 82(17): 8797-811.
- Farquhar, M. J., Hu, K., et al. (2012). "Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis." *J Virol* 86(8): 4305-16.
- Feld, J. J. y Hoofnagle, J. H. (2005). "Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C." *Nature* 436(7053): 967-72.
- Flint, M., Maidens, C., et al. (1999). "Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81." *J. Virol.* 73(8): 6235-6244.

- Flint, M., Logvinoff, C., et al. (2004). "Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins." *J. Virol.* 78(13): 6875-6882.
- Flint, M., von Hahn, T., et al. (2006). "Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection." *J. Virol.* 80(22): 11331-42.
- Forns, X., Thimme, R., et al. (2000). "Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(24): 13318-13323.
- Foy, E., Li, K., et al. (2003). "Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease." *Science* 300(5622): 1145-8.
- Friebe, P., Lohmann, V., et al. (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." *J. Virol.* 75(24): 12047-57.
- Friebe, P. y Bartenschlager, R. (2002). "Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication." *J. Virol.* 76(11): 5326-38.
- Furuse, M., Hirase, T., et al. (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." *J. Cell Biol.* 123(6 Pt 2): 1777-88.
- Furuse, M., Sasaki, H., et al. (1998). "A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts." *J. Cell. Biol.* 143(2): 391-401.
- Garaigorta, U. y Chisari, F. V. (2009). "Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation." *Cell Host Microbe* 6(6): 513-22.
- Garcia-Calvo, M., Lisnock, J., et al. (2005). "The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102(23): 8132-7.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., et al. (2003). "L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100(8): 4498-503.
- Garnier, J., Gibrat, J.-F., et al. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology*. Doolittle, R. F. E. 266: 540-553.
- Gastaminza, P., Cheng, G., et al. (2008). "Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion." *J. Virol.* 82(5): 2120-9.
- Gavel, Y. y von Heijne, G. (1990). "Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering." *Protein Eng.* 3(5): 433-42.
- Ge, D., Fellay, J., et al. (2009). "Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance." *Nature* 461(7262): 399-401.
- Germi, R., Crance, J. M., et al. (2002). "Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption." *J. Med. Virol.* 68(2): 206-15.
- Gibbons, D. L., Ahn, A., et al. (2004). "Multistep regulation of membrane insertion of the fusion peptide of Semliki Forest virus." *J. Virol.* 78(7): 3312-8.
- Goffard, A. y Dubuisson, J. (2003). "Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins." *Biochimie* 85(3-4): 295-301.
- Goffard, A., Callens, N., et al. (2005). "Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *J. Virol.* 79(13): 8400-8409.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., et al. (1990). "Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films." *Eur. J. Biochem.* 193(2): 409-20.
- Goormaghtigh, E., Raussens, V., et al. (1999). "Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes." *Biochim. Biophys. Acta* 1422(2): 105-85.
- Gosert, R., Egger, D., et al. (2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." *J. Virol.* 77(9): 5487-92.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., et al. (2010). "Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication." *J. Virol.* 84(2): 773-87.
- Grakoui, A., Wychowski, C., et al. (1993). "Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products." *J. Virol.* 67(3): 1385-95.
- Gravitz, L. (2011). "Introduction: a smouldering public-health crisis." *Nature* 474(7350): S2-4.
- Gretton, S. N., Taylor, A. I., et al. (2005). "Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci." *J. Gen. Virol.* 86(Pt 5): 1415-21.

- Gupta, E. K. y Ito, M. K. (2002). "Ezetimibe: the first in a novel class of selective cholesterol-absorption inhibitors." *Heart Dis* 4(6): 399-409.
- Haid, S., Pietschmann, T., et al. (2009). "Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles." *J. Biol. Chem.* 284(26): 17657-67.
- Haller, O. y Weber, F. (2007). "Pathogenic viruses: smart manipulators of the interferon system." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 316: 315-34.
- Harada, M., Fujisawa, Y., et al. (2000). "High prevalence of anticardiolipin antibodies in hepatitis C virus infection: lack of effects on thrombocytopenia and thrombotic complications." *J. Gastroenterol.* 35(4): 272-7.
- Harris, H. J., Davis, C., et al. (2010). "Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry." *J Biol Chem* 285(27): 21092-102.
- Harris, H. J., Farquhar, M. J., et al. (2008). "CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry." *J. Virol.* 82(10): 5007-20.
- Harrison, S. C. (2008). "Viral membrane fusion." *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(7): 690-8.
- Heldwein, E. E., Lou, H., et al. (2006). "Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1." *Science* 313(5784): 217-20.
- Helenius, A. y Aebi, M. (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science* 291(5512): 2364-9.
- Helle, F., Goffard, A., et al. (2007). "The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein." *J. Virol.* 81(15): 8101-8111.
- Helle, F., Vieyres, G., et al. (2010). "Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions." *J. Virol.* 84(22): 11905-15.
- Hellen, C. U. y Sarnow, P. (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." *Genes Dev.* 15(13): 1593-612.
- Higginbottom, A., Quinn, E. R., et al. (2000). "Identification of Amino Acid Residues in CD81 Critical for Interaction with Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2." *J. Virol.* 74(8): 3642-3649.
- Hijikata, M., Kato, N., et al. (1991). "Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(13): 5547-51.
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., et al. (1993). "Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes." *J. Virol.* 67(4): 1953-8.
- Hinson, E. R. y Cresswell, P. (2009). "The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106(48): 20452-7.
- Hochuli, E., Dobeli, H., et al. (1987). "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues." *J. Chromatogr.* 411: 177-84.
- Honda, M., Brown, E. A., et al. (1996b). "Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA." *RNA* 2(10): 955-68.
- Honda, M., Ping, L. H., et al. (1996a). "Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA." *Virology* 222(1): 31-42.
- Hope, R. G., Murphy, D. J., et al. (2002). "The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins." *J. Biol. Chem.* 277(6): 4261-70.
- Hsu, M., Zhang, J., et al. (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(12): 7271-7276.
- Huang, H., Sun, F., et al. (2007). "Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(14): 5848-5853.
- Ito, T., Tahara, S. M., et al. (1998). "The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site." *J. Virol.* 72(11): 8789-96.
- Ivanov, A. V., Tunitskaya, V. L., et al. (2009). "Hepatitis C virus NS5A protein modulates template selection by the RNA polymerase in in vitro system." *FEBS Lett.* 583(2): 277-80.
- Jiang, J. y Luo, G. (2009). "Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles." *J. Virol.* 83(24): 12680-91.

- Jirasko, V., Montserret, R., et al. (2008). "Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly." *J. Biol. Chem.* 283(42): 28546-62.
- Jirasko, V., Montserret, R., et al. (2010). "Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly." *PLoS Pathog.* 6(12): e1001233.
- Jo, J., Lohmann, V., et al. (2010). "Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus." *J. Gen. Virol.* 92(Pt 3): 477-93.
- Jones CT, Murray CL, et al. (2007). "Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus." *J. Virol.* 81(16): 8374-8383.
- Jones, D. M. y Mclauchlan, J. (2010). "Hepatitis C Virus: Assembly and Release of Virus Particles" *J. Biol. Chem.* 285(30): 22733-22739.
- Kaito, M., Watanabe S, et al. (1994). "Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study." *J. Gen. Virol.* 75: 1755-1760.
- Kaneko, T., Tanji, Y., et al. (1994). "Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205(1): 320-6.
- Kanto, T., Hayashi, N., et al. (1994). "Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation." *Hepatology* 19(2): 296-302.
- Kapadia, S. B. y Chisari, F. V. (2005). "Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102(7): 2561-6.
- Kapadia, S. B., Barth, H., et al. (2007). "Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I." *J. Virol.* 81(1): 374-383.
- Kato, N., Hijikata, M., et al. (1990). "Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(24): 9524-8.
- Kielian, M. y Rey, F. A. (2006). "Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin." *Nat. Rev. Microbiol.* 4(1): 67-76.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., et al. (1996). "Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide." *Cell* 87(2): 343-55.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., et al. (1998). "Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding." *Structure* 6: 89-100.
- Kim, Y. K., Kim, C. S., et al. (2002). "Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication." *Biochem Biophys Res Commun* 290(1): 105-12.
- Kitadokoro, K., Bordo, D., et al. (2001). "CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs." *EMBO J.* 20(1-2): 12-8.
- Klausner, R. D., Van Renswoude, J., et al. (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells." *J. Biol. Chem.* 258(8): 4715-24.
- Klein, K. C., Polyak, S. J., et al. (2004). "Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly." *J. Virol.* 78(17): 9257-69.
- Klein, K. C., Dellos, S. R., et al. (2005). "Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system." *J. Virol.* 79(11): 6814-26.
- Klenerman, P. y Hill, A. (2005). "T cells and viral persistence: lessons from diverse infections." *Nat. Immunol.* 6(9): 873-9.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., et al. (2000). "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo." *J. Virol.* 74(4): 2046-51.
- Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu. Rev. Biochem.* 54: 631-64.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., et al. (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." *J. Virol.* 80(11): 5308-5320.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., et al. (2007). "The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells." *J. Virol.* 81(2): 588-598.
- Krey, T., d'Alayer, J., et al. (2010). "The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule." *PLoS Pathog.* 6(2): e1000762.

- Krieger, M. (2001). "Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems." *J. Clin. Invest.* 108(6): 793-7.
- Kunkel, M., Lorinczi, M., et al. (2001). "Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein." *J. Virol.* 75(5): 2119-2129.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J. Mol. Biol.* 157(1): 105-32.
- Lackowicz, J.R., (1983). "En *Principle of Fluorescence Spectroscopy*." Plenum Press, New York.: 341-79.
- Laemmli, V. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Lai, C. K., Jeng, K. S., et al. (2008). "Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A." *J. Virol.* 82(17): 8838-48.
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., et al. (2006). "Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes." *Cell* 124(5): 997-1009.
- Lauer, G. M., Barnes, E., et al. (2004). "High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection." *Gastroenterology* 127(3): 924-36.
- Lavillette, D., Tarr, A. W., et al. (2005). "Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus." *Hepatology* 41(2): 265-274.
- Lavillette, D., Bartosch, B., et al. (2006). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes." *J. Biol. Chem.* 281(7): 3909-3917.
- Lavillette, D., Pecheur, E. I., et al. (2007). "Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus." *J. Virol.* 81(16): 8752-8765.
- Lecot, S., Belouzard, S., et al. (2005). "Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis." *J. Virol.* 79(16): 10826-9.
- Lechner, F., Wong, D. K., et al. (2000). "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus." *J. Exp. Med.* 191(9): 1499-512.
- Lee, H., Shin, H., et al. (2004). "cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome." *J. Virol.* 78(20): 10865-77.
- Lentz, B. R., Barenholz, Y., et al. (1976). "Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 2 Two-component phosphatidylcholine liposomes." *Biochemistry* 15(20): 4529-37.
- Lescar, J., Roussel, A., et al. (2001). "The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH." *Cell* 105(1): 137-48.
- Li, K., Foy, E., et al. (2005). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102(8): 2992-7.
- Li, X., Jeffers, L. J., et al. (1995). "Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy." *J. Viral Hepat* 2(5): 227-34.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., et al. (1994). "Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini." *J. Virol.* 68(8): 5063-73.
- Lindenbach, B. D. y Rice, C. M. (2001). *Flaviridae: The Viruses and Their Replication*. Fields Virol. Knipe, D. y Howley, P. M., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.: 41.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., et al. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." *Science* 309(5734): 623-626.
- Liu, S., Yang, W., et al. (2009). "Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection." *J. Virol.* 83(4): 2011-4.
- Liu, S., Kuo, W., et al. (2010). "The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry." *Virology* 407(1): 160-70.
- Lohmann, V., Körner, F., et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." *Science* 285: 110-113.
- Lorenz, I. C., Allison, S. L., et al. (2002). "Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum." *J. Virol.* 76(11): 5480-91.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano J., Dentzer, T. G. and Rice C. M. (2006). "Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease" *Nature Letters* 442: 831-835.

- Love, R. A., Parge, H. E., et al. (1996). "The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site." *Cell* 87(2): 331-42.
- Lozach, P. Y., Amara, A., et al. (2004). "C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles." *J. Biol. Chem.* 279(31): 32035-32045.
- Luik, P., Chew, C., et al. (2009). "The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106(31): 12712-6.
- Lundin, M., Monné, M., Widell, A., von Heijne, G. and Persson, M. A. A. (2003). "Topology of the Membrane-Associated Hepatitis C Virus Protein NS4B" *J. Virol.* 77(9): 5428-5438.
- Ma, Y., Yates, J., et al. (2008). "NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly." *J. Virol.* 82(15): 7624-39.
- Ma, Y., Anantpadma, M., et al. (2011). "Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins." *J. Virol.* 85(1): 86-97.
- Maillard, P., Huby, T., et al. (2006). "The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins." *Faseb. Journal* 20(2): U122-U143.
- Majeau, N., Gagne, V., et al. (2004). "The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation." *J. Gen. Virol.* 85(Pt 4): 971-81.
- Major, M. E., Dahari, H., et al. (2004). "Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees." *Hepatology* 39(6): 1709-20.
- Manzin, A., Solforosi, L., et al. (1998). "Evolution of hypervariable region 1 of hepatitis C virus in primary infection." *J. Virol.* 72(7): 6271-6276.
- Masciopinto, F., Campagnoli, S., et al. (2001). "The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor." *Virus Res.* 80(1-2): 1-10.
- Masciopinto, F., Freer, G., et al. (2002). "Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection." *Virology* 304(2): 187-96.
- McKiernan, S. M., Hagan, R., et al. (2004). "Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source." *Hepatology* 40(1): 108-14.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., et al. (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *Embo J.* 21(15): 3980-3988.
- Meertens, L., Bertaux, C., et al. (2006). "Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles." *J. Virol.* 80(23): 11571-11578.
- Meier, O., Boucke, K., et al. (2002). "Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake." *J. Cell Biol.* 158(6): 1119-31.
- Meola, A., Sbardellati, A., et al. (2000). "Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection." *J. Virol.* 74(13): 5933-5938.
- Merola, M., Brazzoli, M., et al. (2001). "Folding of hepatitis C virus E1 glycoprotein in a cell-free system." *J. Virol.* 75(22): 11205-17.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., et al. (2008). "Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo." *Hepatology* 48(6): 1761-8.
- Meylan, E., Curran, J., et al. (2005). "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus." *Nature* 437(7062): 1167-72.
- Michalak, J.-P., Wychowski, C., et al. (1997). "Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins." *J. Gen. Virol.* 78: 2299-2306.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., et al. (2007). "The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production." *Nature Cell Biology.*
- Mizushima, H., Hijikata, M., et al. (1994). "Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini." *J. Virol.* 68(10): 6215-22.
- Modis, Y., Ogata, S., et al. (2004). "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." *Nature* 427(6972): 313-9.
- Molina, S., Castet, V., et al. (2007). "The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus." *J. Hepatol.* 46(3): 411-419.
- Molina, S., Castet, V., et al. (2008). "Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent." *J. Virol.* 82(1): 569-74.

- Monazahian, M., Böhme, I., et al. (1999). "Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus." *J. Med. Virol.* 57: 223-229.
- Monazahian, M., Kippenberger, S., et al. (2000). "Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus." *Med. Microbiol. Immunol.* 188(4): 177-84.
- Moradpour, D., Penin, F., et al. (2007). "Replication of hepatitis C virus." *Nat. Rev. Microbiol.* 5(6): 453-63.
- Moriya, K., Yotsuyanagi, H., et al. (1997). "Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice." *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 7): 1527-31.
- Murayama, A., Date, T., et al. (2007). "The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells." *J. Virol.* 81(15): 8030-40.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., et al. (2004). "Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture." *J. Virol.* 78(23): 13306-14.
- Neumann-Haefelin, C., Killinger, T., et al. (2007). "Absence of viral escape within a frequently recognized HLA-A26-restricted CD8+ T-cell epitope targeting the functionally constrained hepatitis C virus NS5A/5B cleavage site." *J. Gen. Virol.* 88(Pt 7): 1986-91.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., et al. (2004). "Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver." *J. Gen. Virol.* 85: 1497-1507.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., et al. (2006). "Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients." *J. Virol.* 80(5): 2418-2428.
- Nir, S. y Nieva, J. L. (2000). "Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion." *Progress in Lipid Research* 39: 181-206.
- Nishihara, T., Nozaki, C., et al. (1993). "Secretion and purification of hepatitis C virus NS1 glycoprotein produced by recombinant baculovirus-infected insect cells." *Gene* 129(2): 207-14.
- Op de Beeck, A., Montserret, R., et al. (2000). "The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a mayor role in heterodimerization." *J. Biol.Chem.* 275(40): 31428-31437.
- Op de Beeck, A. y Dubuisson, J. (2003). "Topology of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *Rev. Med. Virol.* 13(4): 233-241.
- Op De Beeck, A., Voisset, C., et al. (2004). "Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins." *J. Virol.* 78(6): 2994-3002.
- Owsianka, A. M., Timms, J. M., et al. (2006). "Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding." *J. Virol.* 80(17): 8695-8704.
- Pacheco, B., Gomez-Gutierrez, J., et al. (2006). "Membrane-perturbing properties of three peptides corresponding to the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein." *Biochim. Biophys. Acta* 1758(6): 755-63.
- Patel, J., Patel, A. H., et al. (2001). "The transmembrane domain of the hepatitis C virus E2 glycoprotein is required for correct folding of the E1 glycoprotein and native complex formation." *Virology* 279(1): 58-68.
- Patel, K. P., Coyne, C. B., et al. (2009). "Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells." *J. Virol.* 83(21): 11064-77.
- Peisajovich, S. G., Blank, L., et al. (2003). "On the Interaction Between gp41 and Membranes: The Immunodominant Loop Stabilizes gp41 Helical Hairpin Conformation." *J. Mol. Biol.* 326: 1489-1501.
- Penin, F., Combet, C., et al. (2001). "Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glicoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment." *J. Virol.* 75(12): 5703-5710.
- Perczel, A., Hollósi, M., et al. (1991). "Decovolution of the circular dichroism spectra of proteins: The circular dichroism spectra of antiparallel -sheet in proteins." *Protein Eng.* 4: 669-679.
- Pérez-Berná, A. J., Moreno, M. R., et al. (2006). "The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins." *Biochemistry* 45(11): 3755-3768.

- Pestka, J. M., Zeisel, M. B., et al. (2007). "Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104(14): 6025-30.
- Petit, J. M., Minello, A., et al. (2007). "Cell surface expression of LDL receptor in chronic hepatitis C: correlation with viral load." *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293(1): E416-20.
- Petracca, R., Falugi, F., et al. (2000). "Structure-Function Analysis of Hepatitis C Virus Envelope-CD81 Binding." *J. Virol.* 74(10): 4824-4830.
- Phan, T., Beran, R. K., et al. (2009). "Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes." *J. Virol.* 83(17): 8379-95.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., et al. (2002). "Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture." *J. Virol.* 76(8): 4008-21.
- Pileri, P., Uematsu, Y., et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." *Science* 282: 938-941.
- Ploss, A., Evans, M. J., et al. (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." *Nature* 457(7231): 882-6.
- Pogulis, R. J., Vallejo, A. N., et al. (1996). "In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR." *Methods Mol. Biol.* 57: 167-76.
- Pohlmann, S., Zhang, J., et al. (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR." *J. Virol.* 77(7): 4070-4080.
- Popescu, C. I., Rouille, Y., et al. (2011). "Hepatitis C virus assembly imaging." *Viruses* 3(11): 2238-54.
- Prendergast, F. G., Haugland, R. P., et al. (1981). "1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers." *Biochemistry* 20(26): 7333-8.
- Prince, A. M., Huima-Byron, T., et al. (1996). "Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins." *J. Viral. Hepat.* 3(1): 11-7.
- Puig, M., Major, M. E., et al. (2004). "Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection." *Vaccine* 22(8): 991-1000.
- Pumeechockchai, W., Bevitt, D., et al. (2002). "Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody." *J Med Virol* 68(3): 335-42.
- Qiao, M., Murata, K., et al. (2003). "Hepatitis C virus-like particles combined with novel adjuvant systems enhance virus-specific immune responses." *Hepatology* 37(1): 52-9.
- Qiu, Q., Wang, R. Y., et al. (2008). "Induction of multispecific Th-1 type immune response against HCV in mice by protein immunization using CpG and Montanide ISA 720 as adjuvants." *Vaccine* 26(43): 5527-34.
- Randall, G., Panis, M., et al. (2007). "Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(31): 12884-9.
- Reiss, S., Rebhan, I., et al. (2011). "Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment." *Cell Host Microbe* 9(1): 32-45.
- Rhinds, D. y Brissette, L. (2004). "The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(1): 39-77.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., et al. (1995). "Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation." *FEBS Lett.* 365(2-3): 115-9.
- Roccasecca, R., Ansuini, H., et al. (2003). "Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2." *J. Virol.* 77(3): 1856-67.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., et al. (2008). "The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry." *PLoS ONE* 3(4): e1866.
- Roche, S., Bressanelli, S., et al. (2006). "Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G." *Science* 313(5784): 187-91.
- Rodríguez-Rodríguez, M., Tello, D., et al. (2009). "Structural properties of the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein." *Virus Res.* 139(1): 91-9.

- Rodriguez, M. (Tesis Doctoral. 2007). "Implicación de la proteína E2 del Virus de la Hepatitis C en las primeras etapas de la infección".
- Roohvand, F., Maillard, P., et al. (2009). "Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein." *J. Biol. Chem.* 284(20): 13778-91.
- Rothwangl, K. B., Manicassamy, B., et al. (2008). "Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding." *Virology* 46: 5: 46.
- Russell, R. S., Kawaguchi, K., et al. (2009). "Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles." *J. Viral. Hepat.* 16(9): 621-32.
- Rychlowska, M., Owsianka, A. M., et al. (2011). "Comprehensive linker-scanning mutagenesis of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins reveals new structure-function relationships." *J. Gen. Virol.* 92(Pt 10): 2249-61.
- Sainz, B., Jr., Barretto, N., et al. (2012). "Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor." *Nat Med* 18(2): 281-5.
- Sakai, A., St Claire, M. S., et al. (2003). "The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(20): 11646-11651.
- Salminen, A., Wahlberg, J. M., et al. (1992). "Membrane fusion process of Semliki Forest virus. II: Cleavage-dependent reorganization of the spike protein complex controls virus entry." *J. Cell Biol.* 116(2): 349-57.
- Santolini, E., Migliaccio, G., et al. (1994). "Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein." *J. Virol.* 68(6): 3631-41.
- Sapir, A., Avinoam, O., et al. (2008). "Viral and developmental cell fusion mechanisms: conservation and divergence." *Dev. Cell* 14(1): 11-21.
- Scarselli, E., Ansuini, H., et al. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." *EMBO J.* 21(19): 5017-5025.
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., et al. (2001). "Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase." *J. Biol. Chem.* 276(47): 44052-63.
- Schmilovitz-Weiss, H., Levy, M., et al. (1993). "Viral markers in the treatment of hepatitis B and C." *Gut* 34(2 Suppl): S26-35.
- Schuck, P. (2000). "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling." *Biophys. J.* 78(3): 1606-1609.
- Schwarz, A. K., Grove, J., et al. (2009). "Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization." *J. Virol.* 83(23): 12407-14.
- Sharma, N. R., Mateu, G., et al. (2011). "Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion." *J. Biol. Chem.* 286(35): 30361-76.
- Shin, K., Fogg, V. C., et al. (2006). "Tight junctions and cell polarity." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 207-35.
- Shoukry, N. H., Grakoui, A., et al. (2003). "Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection." *J. Exp. Med.* 197(12): 1645-55.
- Si, Y., Liu, S., et al. (2012). "A human claudin-1 derived peptide inhibits hepatitis C virus entry." *Hepatology*.
- Silberstein, S. y Gilmore, R. (1996). "Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase." *FASEB J.* 10(8): 849-58.
- Song, Y., Friebe, P., et al. (2006). "The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site." *J. Virol.* 80(23): 11579-88.
- Spangberg, K., Wiklund, L., et al. (2001). "Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro." *J. Gen. Virol.* 82(Pt 1): 113-20.
- Stadler, K., Allison, S. L., et al. (1997). "Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin." *J. Virol.* 71(11): 8475-81.
- Stamatiki, Z., Coates, S., et al. (2007). "Hepatitis C virus envelope glycoprotein immunization of rodents elicits cross-reactive neutralizing antibodies." *Vaccine* 25(45): 7773-84.
- Stamatiki, Z., Shannon-Lowe, C., et al. (2009). "Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells." *Blood* 113(3): 585-93.

- Struck, D. K., Hoekstra, D., et al. (1981). "Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion." *Biochemistry* 20(14): 4093-9.
- Suppiah, V., Moldovan, M., et al. (2009). "IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy." *Nat. Genet.* 41(10): 1100-4.
- Tai, A. W., Benita, Y., et al. (2009). "A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication." *Cell Host Microbe* 5(3): 298-307.
- Takikawa, S., Ishii, K., et al. (2000). "Cell fusion activity of hepatitis c virus envelope proteins." *J. Virol.* 74(11): 5066-5074.
- Tanaka, T., Kato, N., et al. (1995). "A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215(2): 744-9.
- Tanaka, T., Kato, N., et al. (1996). "Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome." *J. Virol.* 70(5): 3307-12.
- Tanaka, Y., Nishida, N., et al. (2009). "Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C." *Nat Genet* 41(10): 1105-9.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., et al. (2004). "The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein." *J. Biol. Chem.* 279(47): 48576-87.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., et al. (2005). "Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase." *Nature* 435(7040): 374-379.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., et al. (2008b). "Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein." *PLoS Pathog.* 4(3): e1000032.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., et al. (2008a). "Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein." *J. Virol.* 82(3): 1073-83.
- Tello, D. (2008). "Análisis Estructural y Funcional del complejo E1E2 del Virus de la Hepatitis C." *Tesis Doctoral*.
- Tello, D., Rodríguez-Rodríguez, M., Yélamos, B., Gómez-Gutiérrez, J., Ortega, S., Pacheco, B., 3, Peterson, D.L., Gavilanes, F. (2010). "Structural properties of a chimeric protein based on the ectodomains of E1 and E2 Hepatitis C Virus envelope glycoproteins" *Prot. Expres. Purific.*
- Thimme, R., Chang, K. M., et al. (2001). "Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51." *J. Virol.* 75(8): 3984-7.
- Thomas, D. L., Thio, C. L., et al. (2009). "Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus." *Nature* 461(7265): 798-801.
- Thomssen, R., Bonk, S., et al. (1992). "Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein." *Med. Microbiol. Immunol.* 181(5): 293-300.
- Timpe, J. M., Stamataki, Z., et al. (2008). "Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies." *Hepatology* 47(1): 17-24.
- Torresi, J., Fischer, A., et al. (2007). "Induction of neutralizing antibody responses to hepatitis C virus with synthetic peptide constructs incorporating both antibody and T-helper epitopes." *Immunology and Cell Biology* 85(2): 169-173.
- Trotard, M., Lepere-Douard, C., et al. (2009). "Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening." *FASEB J.* 23(11): 3780-9.
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., et al. (2006). "Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry." *J. Virol.* 80(4): 1734-1741.
- Van Eck, M., Hoekstra, M., et al. (2008). "Scavenger receptor BI facilitates the metabolism of VLDL lipoproteins in vivo." *J. Lipid Res.* 49(1): 136-46.
- Van Heyningen, W. E., Van Heyningen, S., et al. (1976). "The nature and action of cholera toxin." *Ciba. Found. Symp.* (42): 73-88.
- Van Itallie, C. M. y Anderson, J. M. (2006). "Claudins and epithelial paracellular transport." *Annu. Rev. Physiol.* 68: 403-29.
- Vaney, M. C. y Rey, F. A. (2011). "Class II enveloped viruses." *Cell Microbiol.* 13(10): 1451-9.
- Vieyres, G., Thomas, X., et al. (2010). "Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus." *J. Virol.* 84(19): 10159-68.
- Voisset, C., Callens, N., et al. (2005). "High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I." *J. Biol. Chem.* 280(9): 7793-7799.

- von Hahn, T., Lindenbach, B. D., et al. (2006). "Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells." *Hepatology* 43(5): 932-942.
- von Hahn, T., Yoon, J. C., et al. (2007). "Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo." *Gastroenterology* 132(2): 667-78.
- von Heijne, G. (2006). "Membrane-protein topology." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(12): 909-18.
- Wakita, T., Pietschmann, T., et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." *Nat. Med.* 11(7): 791-6.
- Walewski, J. L., Keller, T. R., et al. (2001). "Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame." *RNA* 7(5): 710-21.
- Walker, C. M. (1997). "Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees." *Springer Semin. Immunopathol.* 19(1): 85-98.
- Walter, P. y Johnson, A. E. (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." *Annu Rev Cell Biol* 10: 87-119.
- Wang, C., Le, S. Y., et al. (1995). "An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region." *RNA* 1(5): 526-37.
- Whidby, J., Mateu, G., et al. (2009). "Blocking hepatitis C virus infection with recombinant form of envelope protein 2 ectodomain." *J. Virol.* 83(21): 11078-89.
- Wimley, W. C. y White, S. H. (1996). "Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces." *Nat. Struct. Biol.* 3(10): 842-848.
- Wyatt, R. y Sodroski, J. (1998). "The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens." *Science* 280(5371): 1884-8.
- Yagnik, A. T., Lahm, A., et al. (2000). "A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2." *Proteins: structure, function, and genetics* 40: 355-366.
- Yanagi, M., Claire, M. S., et al. (1999). "*In vivo* analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after *in vitro* mutagenesis of an infectious cDNA clone." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2291-2295.
- Yang, W., Qiu, C., et al. (2008). "Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus." *J. Biol. Chem.* 283(13): 8643-53.
- Yao, N., Reichert, P., et al. (1999). "Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase." *Structure* 7(11): 1353-63.
- Yi, M., Ma, Y., et al. (2009). "Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation." *PLoS Pathog.* 5(5): e1000403.
- Yu, L. (2008). "The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein." *Curr Opin Lipidol* 19(3): 263-9.
- Yu, X., Qiao, M., et al. (2007). "Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles." *Virology* 367(1): 126-34.
- Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., et al. (2007). "Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81." *Hepatology* 46(6): 1722-31.
- Zhang, J., Randall, G., et al. (2004). "CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection." *J. Virol.* 78(3): 1448-1455.
- Zhang, P., Zhong, L., et al. (2009). "Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106(18): 7537-41.
- Zhang, Y., Corver, J., et al. (2003). "Structures of immature flavivirus particles." *EMBO J.* 22(11): 2604-13.
- Zhong, J., Gastaminza, P., et al. (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(26): 9294-9299.